

# Biokonvertering av tungolje kombinert med løsemiddelekstraksjon

**Karen Leiråmo Jonsen**

Cellebiologi for medisinsk/teknisk personell

Oppgaven levert: Desember 2011

Hovedveileder: Atle M. Bones, IBI

Biveileder(e): Hans Kristian Kotlar, Statoil



Forsidebilde: Canadian Association of Petroleum Producers (2011).<sup>1</sup>

## **Forord**

Masteroppgaven var gitt av Statoil ASA og er avsluttende oppgave ved Cellebiologi for medisinsk teknisk personell, Institutt for biologi, NTNU.

Prosessveileder ved NTNU var professor Atle M. Bones, faglig veileder ved Statoil var seniorspesialist ved avdeling for bioteknologi, Hans Kristian Kotlar.

Oppgaven ble utført i laboratorier på Statoils forskningscenter, Rotvoll og SINTEFs laboratorier, Gløshaugen. Oppgaven er finansiert av Statoil ASA.

Sted:

Dato:

Signatur:

Karen Leiråmo Jonsen

---

## Sammendrag

Bitumen er en svært viskøs råolje som er vanskelig å utvinne. Selv om verdens tungoljereserver er store er det utvunnet svært lite tungolje ved bruk av tradisjonelle utvinningsmetoder. Behovet for drivstoff øker behovet for forskning på alternative måter å utvinne tungoljen som er igjen i de resterende tungoljereservoarene. En optimal metode for å utvinne og omdanne tungolje til bruksolje kunne bidratt til å øke verdens oljeresurser.

Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) er en potensiell kostnadseffektiv og mer miljøvennlig metode å senke viskositeten til oljen på. Ekstremofile mikroorganismer (bakterier og archaea), er av spesiell interesse ved utvikling av metoder for å bryte ned tungoljen til lettere komponenter. Dette er fordi noen av de ekstremofile mikroorganismene bruker hydrokarboner i sin metabolisme som kilde for energi og karbon.

Hensikten med denne oppgaven var å undersøke om biokonvertering (MEOR) i kombinasjon med løsemiddelekstraksjon kunne redusere viskositeten til oljen. Dette ble undersøkt ved ristekolbeforsøk som foregikk over sju dager. Ristekolbene inneholdt mineralmedium (vekstmedium) og olje som eksponeres for to forskjellige mikrobielle konsortier, henholdsvis L004 og ML, i to ulike prøveserier, i kombinasjon med økende konsentrasjoner av en løsemiddelblanding bestående av isopentan, n-pentan, heksan, heptan og oktan.

Mikroorganismene i vannfasen ble undersøkt med denaturerende gradient gel elektroforese (DGGE) for å se om de hadde en ulik biodiversitet før, under og etter ristekolbeforsøket. Dette kunne indikere om det var en eller flere arter som deltok i biokonverteringen. Resultatene viste indikasjon på høy biodiversitet både før, under og etter ristekolbeforsøket, med noen forskjeller i biodiversitetsmønster.

Oljefasen ble analysert med elektropray ioniserende massespektrometri (ESI-MS), for å se på en aktuell endring i masse/ladnings forhold sammenlignet med olje som ikke hadde gjennomgått ristekolbeforsøk. Resultatene indikerer at det har foregått endringer i oljesammensetningen på molekylnivå og at biokonvertering i kombinasjon med løsemiddel har en potensiell degraderende effekt på de tunge komponentene i oljen. Mer forskning på biokonvertering i kombinasjon med løsemiddel må til for å kunne si mer om denne indikasjonen.

## **Abstract**

Bitumen is a very viscous crude oil that is difficult to extract because of the oil's high viscosity. Even though the world's heavy oil reserves are large, extraction with traditional production methods are minimal. The need for fuel increases the need for researching alternative methods for recovering heavy oil that remains in the oil reservoirs.

An optimal method to extract and convert heavy oil to conventional oil could increase the world's oil resources.

Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) has the potential to be a cost-effective and a more environmentally friendly way to lower the viscosity of the oil. Extremophile microorganisms are prokaryotic organisms (bacteria and archaea) of particular interest in the development of methods for breaking down heavy oil to lighter components. This is because some of the extremophile microorganisms use hydrocarbons in their metabolism as their main source of energy and carbon.

The purpose of this master thesis was to investigate whether bioconversion (MEOR) in combination with hot solvent extraction could reduce the viscosity of the oil. This was investigated by shake flask experiments that lasted for seven days. The shake flasks contained a growth medium and two microbial consortiums, respectively L004 and ML, in combination with increasing concentrations of a hot solvent mixture consisting of isopentane, n-pentane, hexane, heptane and octane.

Microorganisms in the water phase were examined with denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to see if they had a different biodiversity before, during and after the shake flask experiment. The results showed indication of high biodiversity, both before, during and after the shake flask experiment, with some difference in biodiversity patterns. The oil phases were analyzed with Electrospray Ionization – Mass Spectrometry (ESI-MS) to detect an actual change in the mass/charge ratio compared with oil that had not undergone shake flask experiments.

The results indicate that there have been changes in oil composition at the molecular level and that bioconversion in combination with solvent has a potential degrading effect on the heavy oil components.

More research on bioconversion in combination with solvent is needed to be able to say more about this indication.

## Innhold

Forord .....	I
Sammendrag .....	II
Abstract .....	III
1. Innledning .....	1
1.1. Bakgrunn .....	1
1.2. Microbial enhanced oil recovery (MEOR) - Økt oljeutvinning ved hjelp av mikroorganismer .....	4
1.3. Biokonvertering av tungolje .....	6
1.4. Målet med oppgaven .....	6
2. Material .....	7
2.1. Olje .....	7
2.2. Inokulum (Mikrobielt konsortium) .....	7
2.3. Løsemiddel .....	7
2.4. Dyrkningsmedium .....	8
3. Metode .....	9
3.1. Forsøksoversikt .....	9
3.2. Forarbeid ristekolbeforsøk: .....	11
3.3.1. OD-måling og justering av OD-verdi av inokulum før tilsats i ristekolber: ..	11
3.3. Generell prosedyre for ristekolbeforsøkene .....	11
3.4. Beskrivelse av oppsettet til ristekolbeforsøk 1 .....	12
3.5. Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 1 .....	13
3.5.1. Forberedelser: .....	13
3.5.2. Ristekolbeforsøk, dag 1 .....	13
3.5.3. Ristekolbeforsøk, dag 3: .....	14
3.5.4. Ristekolbeforsøk dag 7 .....	14
3.6. Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 2 .....	15
3.7. Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 3 .....	17
3.8. Etterarbeid ristekolbeforsøk: .....	19
3.8.1. Bilder av ristekolbene .....	19
3.8.2. Mikroskopi av vannfasen til ristekolbene: .....	19
3.8.3. DNA-isolering og måling av DNA- produkt isolert fra vannfasen .....	20
3.8.4. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifisering .....	21
3.8.5. 16S rRNA PCR av isolert DNA for produktsjekk av bakterier .....	22
3.8.6. 16S rRNA PCR av isolert DNA for produktsjekk av archaea .....	23
3.8.7. Produktsjekk av 16S rRNA PCR-produkt (bakterie og archaea) med agarosegelelektroforese .....	24
3.8.8. Karakterisering av biodiversitet ved PCR/DGGE .....	24
3.8.9. Amplifisering av DNA-produkt til DGGE med PCR .....	25
3.8.10. Oljekarakterisering (ristekolbeforsøk 2 og 3) – Elektrospray ioniserende massespektrometri (ESI-MS): .....	27
4. Resultater .....	29
4.1. Ristekolbeforsøk 1: .....	29
4.1.1. OD-måling av inokulum før og etter reinokulering .....	29
4.1.2. Bilder av ristekolber og mikroskopi av vannfase .....	29
4.1.3. Måling av DNA-konsentrasjon fra DNA-isolering .....	31
4.1.4. Analyse av 16S rRNA PCR-produkt for produktsjekk av bakterie og archaea på agarosegel .....	31

4.1.5.	Analyse av 16S rRNA PCR-produkt med clamp på agarose- og DGGE gel	32
4.1.6.	Samletabell for resultater, ristekolbeforsøk 1	36
4.2.	Ristekolbeforsøk 2:	38
4.2.1.	OD-måling av inokulum før og etter reinokulering	38
4.2.2.	Visuell gradering av olje i vannfasen	38
4.2.3.	Bilder av ristekolbene og mikroskopi av vannfase	39
4.2.4.	Måling av DNA-konsentrasjon fra DNA-isolering	42
4.2.5.	Analyse av 16S rRNA PCR-produkt for produktsjekk av bakterie og archaea på agarosegel	42
4.2.6.	Analyse av 16s rRNA PCR-produkt på agarose- og DGGE gel	43
4.2.7.	ESI-MS, ristekolbeforsøk 2	47
4.2.8.	Samletabell, ristekolbeforsøk 2	50
4.3.	Ristekolbeforsøk 3	52
4.3.1.	OD-verdier av inokulum etter reinokulering	52
4.3.2.	Visuell gradering av olje i vannfasen	52
4.3.3.	Bilder av ristekolbene og mikroskopi av vannfase	53
4.3.4.	Måling av DNA-konsentrasjon fra DNA-isolering	57
4.3.5.	Analyse av 16S rRNA PCR-produkt for produktsjekk av bakterie og archaea på agarosegel	57
4.3.6.	Analyse av 16s rRNA PCR-produkt på agarose- og DGGE gel	58
4.3.7.	ESI-MS, ristekolbeforsøk 3	65
4.3.8.	Samletabell, ristekolbeforsøk 3	68
5.	Diskusjon	70
6.	Referanser:	77
<b>VEDLEGG</b>		<b>80</b>



# 1. Innledning

## 1.1. Bakgrunn

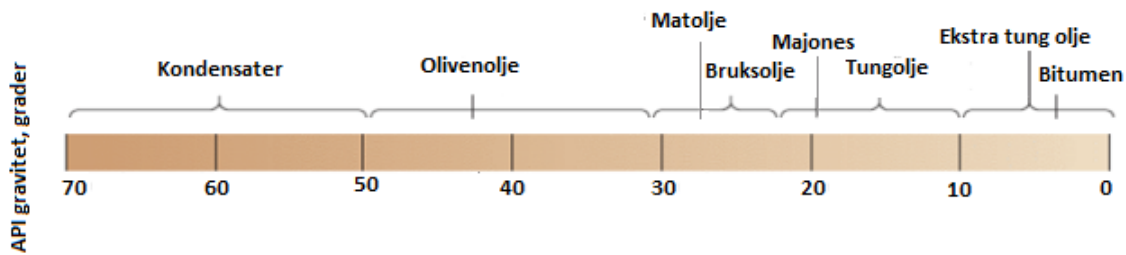
Verdens tungoljereserver er store, men i mange tilfeller er det utvunnet så lite som 7 – 8 % tungolje fra disse reservoarene ved bruk av tradisjonelle utvinningsmetoder.<sup>2</sup> De resterende oljereservene er estimert til å bestå av ca. 70 % tungolje.<sup>3</sup>

Tungolje er svært vanskelig å utvinne på grunn av blant annet de fysiokjemiske egenskapene til reservoaret og den høye viskositeten til oljen. Porestørrelsen til formasjoner, grad av poresammensetning, permeabiliteten og overflatespenningen mellom olje og mineraler påvirker oljeutvinningen ved at oljen holdes igjen. Komponentene som gjør oljen så viskøs kan deles inn i fire fraksjoner etter løselighet: Mettede hydrokarboner (alkaner, parafin og voks), aromatiske hydrokarboner, resiner og asfaltener (SARA fraksjoner, fra engelsk: Saturated hydrocarbons, aromatic hydrocarbons, resins and asphaltenes). Tungolje består også av heteroatomer som nitrogen, svovel og oksygen, kombinert med aromater og metaller som nikkel, vanadium, jern og kobber.<sup>4, 5</sup>

Mettede hydrokarboner er upolare karbonatom i ringer eller lange kjeder. Aromatiske hydrokarboner består av en eller flere ringstrukturer som kan ha en eller flere alifatiske grener mens resiner og asfaltener er mer polare og består av mange aromatiske strukturer med noen alifatiske grener. Resiner kan også være forbundet inne i aggregater av asfalten molekyler.

Asfaltener er den største og mest komplekse komponenten av SARA-fraksjonene og bidrar mest til den høye viskositeten til oljen. Dette er på grunn av blant annet Van der Waalskrefter som holder molekylene sammen og frie radikale bindingssteder som er involvert i kompleksdannelse, inter- og intramolekylære reaksjoner og molekylær rearrangering.<sup>4, 6</sup>

Oljens økonomiske verdi korrelerer grovt sett med viskositeten, uttrykt som °API (American Petroleum Institute gravity). Lette, hydrogenrike oljer har høy °API-verdi, mens karbonrike oljer som tungolje, har lav API-verdi. °API verdien rangeres mellom 10 og 20 for tunge oljer og under 10 for ekstra tung olje og bitumen (figur 1). Tungolje har en lavere økonomisk verdi enn konvensjonell olje.<sup>7</sup>



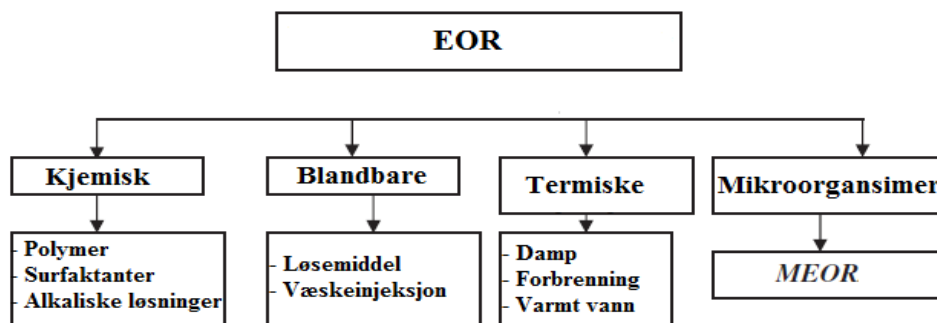
**Figur 1: Spesifikk tetthet ( $^{\circ}$ API)**

Figuren viser karbonholdige forbindelser med ulike spesifikk tetthet, bitumen som blir brukt i dette forsøket har tetthet på  $8^{\circ}$ API. Inspirert av: University of Illinois Chicago (2007).<sup>8</sup>

De tradisjonelle metodene for produksjon, transport og raffinering av tungolje er kostbare og ikke spesielt miljøvennlige. (Hans Kristian Kotlar, personlig kommunikasjon 2011)<sup>5</sup>

Behovet for drivstoff øker behovet for forskning på alternative måter for å utvinne tungoljen som er igjen i reservoarene.

Enhanced Oil Recovery (EOR) er en alternativ metode som øker oljeutvinning. Flytdiagrammet vist i figur 2 viser noen av EOR typene som finnes og hvilke metoder som blir brukt. EOR består av metoder som for eksempel kjemiske prosesser (tilsetning av polymerer, surfaktanter og alkaliske løsninger), blandbare prosesser (løsemiddel- og væskeinjeksjon), termiske prosesser (damp og forbrenning) og mikroorganismer (bruk av mikroorganismer og metabolske produkt, MEOR).



**Figur 2: EOR**

Flytdiagrammet viser noen av EOR-typene som finnes og hvilke metoder som blir brukt. Inspirert av: Sen (2008).<sup>9</sup>

Metoden hvor EOR og mikroorganismer brukes sammen heter Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR) og har potensialet til å være en kostnadseffektiv og mer miljøvennlig måte å senke viskositeten til oljen på.<sup>5, 9, 10</sup>

Ekstremofile mikroorganismer er prokaryote organismer (bakterier og archaea) som kan overleve ved svært høye temperaturer, høy saltkonsentrasjon, svært høy/lav pH og ekstremt høyt trykk. Visse ekstremofile mikroorganismer, eller cellefrie enzymesystem fra slike organismer i oljereservoar, er av spesiell interesse ved utvikling av metoder for å bryte ned tungoljen til lettere komponenter da disse kan øke utvinningen av tungolje. Dette kommer av at enkelte av de ekstremofile mikroorganismene kan bruke hydrokarboner i sin metabolisme som deres kilde for energi og karbon. Disse mikroorganismene tåler også et høyt nivå av potensielle toksiske organiske og uorganiske komponenter som er til stede i oljereservoar.<sup>11</sup> Ved optimale vekstforhold vil enkelte av de ekstremofile mikroorganismene være i stand til å endre noen av de tunge komponentene i tung og ekstra tung olje. Noen er også i stand til å emulgere oljen fullstendig i vann. (Hans Kristian Kotlar, personlig kommunikasjon, 2011) Metoden hvor mikroorganismer bryter ned de tunge komponentene i tungolje til lettere komponenter, enten *in situ* (i oljereservoar) eller etter utvinning av olje, kan derfor ha en stor innvirkning på viskositeten til oljen. Dette er viktig for økt oljeutvinning fra reservoar og en reduksjon av transport- og prosesseringskostnader. Metoden vil i tillegg kunne redusere energiforbruket og mengden produksjonskjemikalier som blir brukt i vanlige utvinningsmetoder. (Hans Kristian Kotlar, personlig kommunikasjon, 2011)

## 1.2. Microbial enhanced oil recovery (MEOR) - Økt oljeutvinning ved hjelp av mikroorganismer

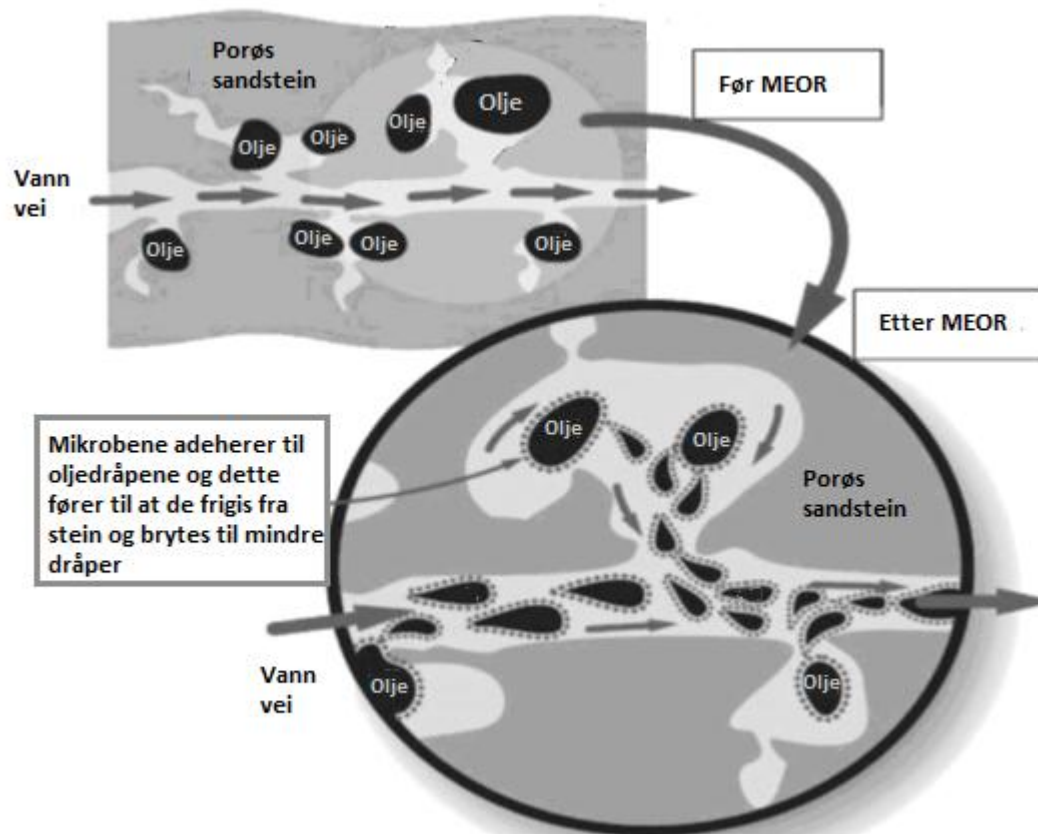
Økt oljeutvinning ved hjelp av mikroorganismer (MEOR) er en metode som brukes for å stimulere vekst av mikroorganismer slik at man kan øke produksjonen av olje fra et reservoar. MEOR har potensialet til å øke utbyttet av olje fra reservoarer der oljen sitter fast i kapillærporene til kildebergarter og i områder hvor oljen ikke kan utvinnes med klassiske EOR-metoder. Mikroorganismene kan være naturlig forekommende eller bli injisert i reservoaret, og veksten blir stimulert ved å tilsette næringsstoffer i injeksjonsvannet. Siden mikroorganismene befinner seg i vannfase må de trenge gjennom olje- og vanngrenseflaten for å kunne vokse. Dette gjør de ved å produsere overflateaktive stoffer (biosurfaktanter) som reduserer grenseflatespenningen mellom olje og vann.<sup>4,5</sup> Figur 3 viser en tenkt forandring på oljen før og etter bruk av MEOR ved at mikroorganismene trenger gjennom vanngrenseflaten.



**Figur 3: Tenkt molekylforandring ved bruk av MEOR**  
 Mikroorganismene bryter vanngrenseflaten og når inn til hydrokarbonene. De grå/brune klumpene er sand og store molekyler, inspirert av: Research Institute Of Petroleum Industry (2009).<sup>12</sup>

Mikroorganismene blir introdusert i brønner for å produsere biprodukt, som for eksempel biosurfaktanter, biopolymer, biomasse, syrer, løsemiddel, enzymer eller gasser som bidrar til å drive oljen ut fra brønnene. MEOR kan være en kombinasjon av flere mekanismer, men hovedmekanismen er forandring av grenseflatespenning og degradering av tunge molekyler (mettede hydrokarboner). Når asfaltener brytes opp, splittes de store molekylene og resiner frigis. Dette fører til at molekylvekten og viskositeten til oljen reduseres. Siden disse prosessene bidrar til å mobilisere oljen og hjelper til med oljegjennomstrømningen vil de føre til at en større mengde olje blir utvunnet fra reservoaret.<sup>2, 5, 6, 9</sup>

Et eksempel på tilstanden til olje i en porøs sandstein før og etter MEOR er vist i figur 4.



**Figur 4:**

*Før MEOR prosessen sitter oljen fast i porøs sandstein. Ved vannflømming løsner ikke oljedråpene fra de små porene i sandsteinen. Etter MEOR prosessen adherer mikroorganismene til oljedråpene og fører til at de løsner fra de små porene mellom sandstein. Inspirert av: Sen (2008).<sup>9</sup>*

Fordeler med MEOR er blant annet at injiserte mikroorganismer er miljøvennlige, billige, enkle å håndtere og uavhengig av oljepriser. MEOR er økonomisk attraktiv i oljefelt der det ikke kan utvinnes mer olje ved hjelp av tradisjonelle metoder. I disse eksisterende oljebrønnene trengs det få modifikasjoner, det vil si at det koster mindre å ta i bruk en slik prosess enn en tradisjonell/konvensjonell oljeutvinningsmetode. Ulemper med MEOR er blant annet at mikroorganismer, og deres biprodukter av metabolismen (f.eks. jernhydroksid), kan forårsake tilstopping av porer og at korrosjon kan oppstå som følge av at mikroorganismene produserer hydrogen sulfid. En annen ulempe er at ettersom det er biologiske system som brukes, er det ikke selvsagt at de samme resultatene som oppnås i laboratorieforsøk kan overføres til oljefeltene. I et oljefelt vil det kunne oppstå en konkurranse mellom de tilførte mikroorganismene og de mer adapterte mikroorganismene som er tilstede i reservoaret. Dette kan muligvis føre til en utkonkurrering av de tilsatte mikroorganismene. En annen utfordring er at reservoarheterogeniteten og forskjell i oljekomposisjon gjør at en utvinningsmetode som virker optimalt i ett reservoar, ikke nødvendigvis vil være overførbart til andre reservoar.<sup>5, 9, 13</sup>

### 1.3. Biokonvertering av tungolje

Biokonvertering av tungolje er en versjon av MEOR der de tunge komponentene i oljen brytes ned til lettere komponenter ved hjelp av mikroorganismer. Biokonvertering blir brukt for å redusere viskositeten til oljen slik at oljen blir lettere å utvinne.<sup>2</sup>

Flere studier utført på Statoil forskningssenter indikerer at mikroorganismene har en innvirkning på de tunge oljekomponentene ved at de metaboliserer hydrokarbonene og at dette fører til en reduksjon i viskositeten til oljen. (Hans Kristian Kotlar, personlig kommunikasjon, 2011)<sup>14, 15</sup>

### 1.4. Målet med oppgaven

Målet med denne oppgaven er å studere biokonvertering av en ekstra tung olje (bitumen) kombinert med løsemiddelekstraksjon. Dette skal gjøres ved ristekolbeforsøk som går over sju dager. Oljen skal eksponeres for to forskjellige inokulum (se avsnitt 2.2, side 7) i to ulike prøveserier, kombinert med ulike konsentrasjoner av en løsemiddelblanding bestående av isopentan, n-pentan, heksan, heptan og oktan.

Tre ristekolbeforsøk ble utført for å kunne si noe om innvirkningen inokulum og løsemiddelet har på oljen:

- 1) Studere løsemiddelets effekt på inokulum.
- 2) Studere inokulumets effekt på oljen ved økende løsemiddelkonsentrasjoner.
- 3) Studere løsemiddelets effekt på oljen.

## 2. Material

En totaloversikt over kjemikalier, kit og utstyr som ble brukt i ristekolbeforsøkene er vist i vedlegg A, side 81. Navn på produsent av material, kit og kjemikalier som blir brukt under ristekolbeforsøkene, nevnes første gang det er nevnt i teksten.

### 2.1. Olje

Oljen som ble bruk i dette ristekolbeforsøket var Leismer oljesand fra Alberta, Canada. Dette er en ekstra tung olje (bitumen) med °API verdi på 8.

### 2.2. Inokulum (Mikrobielt konsortium)

To mikrobielle konsortier ble brukt i ristekolbeforsøkene, henholdsvis L004 og ML. Deres opphav er konfidensielt, men det kan nevnes at de er isolert fra oljesand, leirvulkan, prosessvann fra vannrenseanlegg og oljerelaterte prøver fra flere lokasjoner. (Hans Kristian Kotlar, personlig kommunikasjon, 2011)

L004 er beriket på mineralmedium med acetat og gjærekstrakt (MMAcYE) og består av en blandet populasjon av aerobe og fakultativt anaerobe mikroorganismer som vokser ved 60 °C. ML er en miljøprøve beriket på RMMAcYE som er et mineralmedium med acetat, gjærekstrakt, pepton og trypton. ML har en optimal veksttemperatur på 35 °C. Begge konsortia er dyrket på 96-brønnsplater av Statoil/SINTEF og reinokulert for bruk i biokonverteringsforsøk. Disse platene blir heretter kalt originalplater.

### 2.3. Løsemiddel

Løsemiddel som er brukt i denne oppgaven er en blanding av isopentan, n-pentan, heksan, heptan og oktan (tabell 1). Denne kombinasjonen er hentet fra forsøk som blir utført i Norge og Canada der de eksperimenterer med forskjellige ekstraksjonsmetoder ved hjelp av damp og løsemiddel. (Espen Kowalewski, e-post, 10. januar 2011) Innholdet i løsemiddelblanding som brukes i disse forsøkene er vist i vedlegg B, side 84. Det antas at løsemiddelet vil virke inn på oljen ved å frigjøre mer av de lette komponentene i oljen, slik at de blir lettere tilgjengelig for mikroorganismene og dermed øker effekten av biokonverteringen.

**Tabell 1: Tilsatt løsemiddel**

*Prosentvis fordeling av løsemiddel per 100 ml*

Løsemiddel	Mengde (%)
Isopentan	32,61 %
N-pentan	32,16 %
Heksan	22,96 %
Heptan	8,28 %
Oktan	3,99 %
Totalvolum	100,0 %

## 2.4. Dyrkningsmedium

Det ble brukt tre forskjellige vekstmedier i dette ristekolbeforsøket (tabell 2). Mineralmedium (MM), mineralmedium med fosfat, acetat og gjærekstrakt (MMAcYE), og beriket mineralmedium med fosfat, acetat, gjærekstrakt, pepton og trypton (RMMAcYE). Acetat og gjærekstrakt bidrar som karbonkilde, i tillegg bidrar gjærekstrakten med blant annet aminosyrer og andre cellulære komponenter. Fosfat, pepton og trypton bidrar som ekstra næring til cellenes metabolisme og vedlikehold.

RMMAcYE ble brukt for å skape et spesielt gunstig vekstgrunnlag for oppvekst fra originalplater med inokulum. MM ble brukt til vask og klargjøring av inokulum for å få vekk rester av reinokuleringsmediet RMMAcYE før de ble tilsatt i ristekolbeforsøket. MMAcYE ble brukt som vekstmedium for inokulatene som ble inkubert med olje under biokonverteringen. Innhold og fremgangsmåte for produksjon av mediene er vist i vedlegg C, side 86.

### **Tabell 2: Mineralmedium og bruksområde**

Tabellen viser en oversikt over hvilke mineralmedium som blir brukt i ristekolbeforsøkene og hva de brukes til.

<b>Mineralmedium</b>	<b>Bruk</b>
Beriket mineralmedium med acetat og gjærekstrakt (RMMAcYE)	Reinokulering
Mineralmedium med acetat og gjærekstrakt (MMAcYE)	Biokonvertering
Mineralmedium (MM)	Vasketrinn



### 3. Metode

#### 3.1. Forsøksoversikt

Som beskrevet i kapittel 1.4 ble oppgaven delt opp i tre ristekolbeforsøk. Ristekolbeforsøk 1 ble utført for å studere effekten løsemiddelet hadde på inokulumet. Ristekolbeforsøk 2 ble utført for å undersøke biokonvertering av tungolje i kombinasjon med løsemiddel. Ristekolbeforsøk 3 ble utført for a) å se hvilken effekt løsemiddelet har på olje, og samtidig b) reproducere deler av ristekolbeforsøk 2 med mikroorganismer tatt fra nedfrosne mikroorganismer på glyserolampuller fra ristekolbeforsøk 2 (vist i tabell 3).

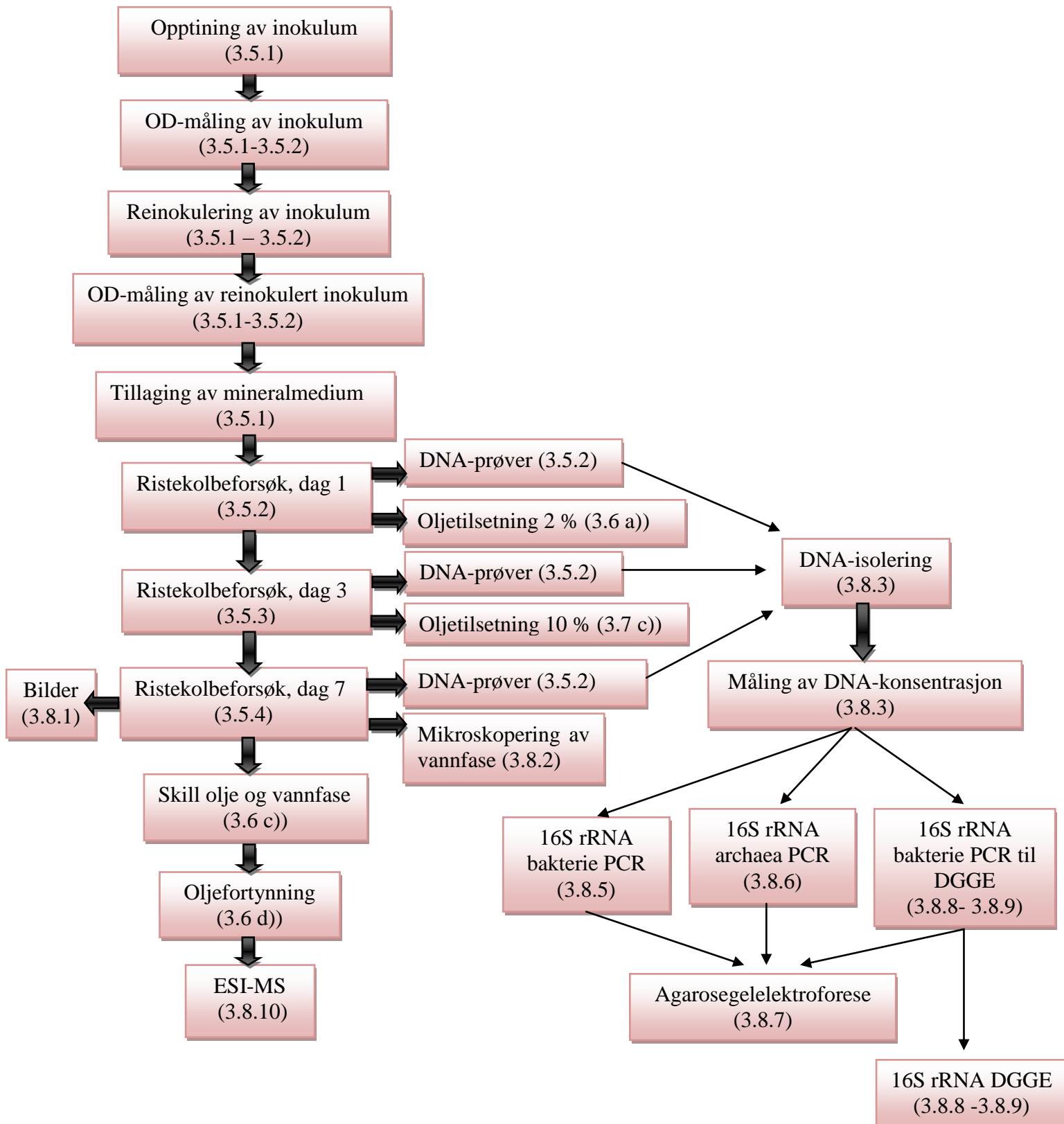
Ved å sammenligne resultater fra disse tre ristekolbeforsøkene kan man muligens si noe om effekten løsemiddelet, inokulum og en kombinasjon av disse har på oljen.

En oversikt for hele forsøksprosessen inkludert forarbeid, ristekolbeforsøk og analysearbeid er vist i et flytskjema i figur 5.

**Tabell 3: Forsøksoppsett, ristekolbeforsøk 1, 2 og 3.**

*Kolonnen til venstre viser innhold i ristekolbene.*

Ristekolbeforsøk 1	MMAcYE, løsemiddel og inokulum
Ristekolbeforsøk 2	MMAcYE, løsemiddel, inokulum og olje
Ristekolbeforsøk 3	a) MMAcYE, løsemiddel og olje. b) MMAcYE, løsemiddel, inokulum og olje



**Figur 5: Flytskjema over forløpet i et ristekolbeforsøk**

Figuren viser et flytskjema med oversikt over forsøksprosessen. Tallene bak metodene viser til kapittel hvor prosessen er forklart. Merk at forsøk 1 ikke tilsettes olje og dermed vil trinnene med tilsats av olje, skilling av olje fra vannfase og oljefortynning ikke tilhøre dette forsøket.

### **3.2. Forarbeid ristekolbeforsøk:**

#### **3.3.1. OD-måling og justering av OD-verdi av inokulum før tilsats i ristekolber:**

Et spektrofotometer (FLUOstar Omega, BMG LABTECH GmbH) ble brukt for å måle OD ved 660 nm fra originalplater med inokulum (96-brønnsplater, Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc) og reinokulert inokulum. Dette ble gjort for å sammenligne OD med originalplatene for å forsikre tilstrekkelig vekst i de reinokulerte inokula. OD over 0,05 indikerer vekst. Inokula ble så standardisert ved hjelp av en prosedyre utviklet ved SINTEF for å gi  $OD_{660nm} = 1$  per ml, (se vedlegg D, side 89).

Dette ble gjort for å gi samme utgangspunkt for begge inokula.

#### **3.3. Generell prosedyre for ristekolbeforsøkene**

Ristekolbeforsøk 1 ble utført ved å blande mineralmedium (MMAcYE), inokulum og løsemiddel i respektive kolber (250 ml) og inkubere kolbene i 7 dager med risting (110 RPM) og optimal temperatur for mikroorganismene (L004 ved 60 °C og ML ved 35 °C).

Samme metode ble brukt i ristekolbeforsøk 2 og 3, men med blanding av henholdsvis mineralmedium (MMAcYE), inokulum, løsemiddel og bitumen i respektive kolber i ristekolbeforsøk 2 og mineralmedium (MMAcYE), løsemiddel og bitumen i respektive kolber i ristekolbeforsøk 3 ved samme riste- og temperaturbetingelser og lengde som i ristekolbeforsøk 1.

Mineralmediet (MMAcYE) ga et næringsrikt vekstmedium for mikroorganismene slik at de kunne formere seg i ristekolbene. Dette ga mulighet for videre analyse av løsemiddelets påvirkning i ristekolbeforsøk 1 og biokonverteringsgrad i ristekolbeforsøk 2 og 3. Merk at kolbene kalt negativ kontroll L004 og negativ kontroll ML, er oljeprøve kun tilsatt mineralmedium (MMAcYE) og er uten tilsats av hverken inokulum eller løsemiddel. Negative kontroller er satt opp for begge prøveseriene; L004 og ML. Forskjellene mellom de negative kontrollene vil være at prøveserien til L004 blir kjørt ved 60 °C og prøveserien til ML blir kjørt ved 35 °C.

Høy temperatur og risting alene kan føre til at vannløselige fraksjoner elueres fra oljen. (Hans Kristian Kotlar, personlig kommunikasjon, 2011)

Dette vil bli tatt hensyn til ved å analysere nativ olje (ubehandlet olje) mot en negativ kontroll med olje som ikke er blitt tilsatt mikroorganismer eller løsemiddel. Den native oljen gjennomgår ikke ristekolbeforsøk, men vil bli fortynnet med diklormetan for å sammenligne oljefraksjonene med ristekolbeforsøk 2 og 3.

### 3.4. Beskrivelse av oppsettet til ristekolbeforsøk 1

Ristekolbeforsøk 1 ble utført for å sjekke mikroorganismenes toleranse for løsemiddelblandingen uten tilsats av olje. Innhold i ristekolbene er oppført i tabell 4 og i vedlegg E, side 92. Beregnet mengde løsemiddel tilsettes fra 5 - 50 % av totalvolumet olje (5 g) som skal tilsettes i ristekolbeforsøk 2 og 3. Negativ kontroll skal utelukke kontaminering og består kun av mineralmedium (MMAcYE). Prøve 1 viser hvordan mikroorganismene vokser med mineralmedium (MMAcYE) uten tilsats av løsemiddel. Prøve 2-5 viser mikroorganismenes toleranse for økende konsentrasjoner av løsemiddel.

**Tabell 4: Innhold ristekolber, ristekolbeforsøk 1**

Tabellen viser tilsetning i respektive ristekolber. Merk at inokulum ML og L004 tilsettes i hver sine kolber. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

Prøver	Tilsatt løsemiddel (%)	Tilsatt løsemiddel (ml)	Tilsatt inokulum (ml) 1 OD/ml	Tilsatt olje (g)	Tilsatt mineralmedium (ml)
Negativ kontroll #	0,00	0,00	0,00	0,00	50,00
Prøve 1 (0 % løsemiddel)	0,00	0,00	1,00	0,00	49,00
Prøve 2 (5 % løsemiddel)	5,00	0,25	1,00	0,00	48,75
Prøve 3 (15 % løsemiddel)	15,00	0,75	1,00	0,00	48,25
Prøve 4 (30 % løsemiddel)	30,00	1,50	1,00	0,00	47,50
Prøve 5 (50 % løsemiddel)	50,00	2,50	1,00	0,00	46,50

### 3.5. Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 1

#### 3.5.1. Forberedelser:

Mineralmedium MMacYE, MM og RMMacYE samt løsningene; fosfatløsning, spormineraløsning (TMS, 1:1:1) og vitaminløsning ble laget (se vedlegg C, side 86).

Nedfryste inokulum (ML og L004) på 96-brønnsplater ble tint og  $OD_{660nm}$  ble målt på spektrofotometer (vedlegg D, tabell D-1-1 og D-1-2, side 89). Inokulum (20  $\mu$ l) ble så tatt ut og reinokulert i en 96- dypbrønnsplate (V96 Deep well, MASTERBLOCK, Greiner - Bio - One International GmbH) som var tilsatt beriket mineralmedium, RMMacYE (800  $\mu$ l).

L004 ble inkubert i fire dager og ML i én dag ved henholdsvis 60 °C og 35 °C ved 800 RPM med 56 % fuktighet i et inkuberingskap (Minitron, Infors AG).

#### 3.5.2. Ristekolbeforsøk, dag 1

Det ble tatt av 200  $\mu$ l oppdyrket inokulum fra L004 og ML som ble overført til to nye, respektive 96-brønnsplater.  $OD_{660nm}$  ble målt av de reinokulerte platene (vedlegg D, tabell D-2-1 og D-2-2, side 90). Dette ble gjort for å sammenligne OD fra den reinokulerte platen med originalplaten (vist i vedlegg D, tabell D-1-1 og D-1-2) for å forsikre tilstrekkelig vekst av mikroorganismer ( $OD_{660nm} > 0,05$ ).

Inokulumet ble standardisert som beskrevet i vedlegg D-2, side x. Mengden MM som skulle tilsettes for at  $OD = 1/ ml$  ble beregnet (Vedlegg D, formel 1, side 91). Mikrobemengden i hver kultur var nå lik og biokonverteringsgraden kunne sammenlignes.

Ristekolbene ble tilsatt mineralmedium (MMacYE), inokulum (L004/ML) og løsemiddel i respektive kolber som vist i tabell 4 (se også vedlegg E, tabell E-1, side 92).

Det ble tatt av 1 ml av vannfasen som skulle brukes til DNA – analyser fra prøve 1 og dette ble sentrifugert (14000 RPM i 20 min). Bakterieoppbevaring på glyserolampuller (1 ml fra vannfasen) ble fryst ned i safe-lock rør (Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc.) med 50 % glyserol slik at sluttkonsentrasjonen av glyserol ble 20 % (se vedlegg E-2, formel 2, side 92). Dette ble gjort for å kunne reprodusere forsøket dersom det skulle være ønskelig. Glyserol oppløst i vann reduserer skaden iskrystaller har på organismer lagret i frossen løsning. Dette gjør at celleveggen holdes intakt og beskytter cellene fra å sprekke under nedfrysing og tining.<sup>16</sup> Ristekolbene ble satt til inkubering i risteinkubator (Multitron, Infors AG) ved 60 °C for prøveserie med inokulum L004 og 35 °C for prøveserie med inokulum ML ved 110 RPM med 54 % fuktighet i 2 døgn.

### **3.5.3. Ristekolbeforsøk, dag 3:**

Dag 3 ble det tatt av 1 ml til DNA-analyse og 1 ml til bakterieoppbevaring på glyserolampuller fra vannfasen i hver ristekolbe som tidligere beskrevet (ristekolbeforsøk 1, dag 1, kapittel 3.5.2, side 13). Ristekolbene ble inkubert i risteinkubator ved 60 °C (prøveserie L004) og 35 °C (prøveserie ML), 110 RPM og 54 % fuktighet i ytterligere 5 døgn.

### **3.5.4. Ristekolbeforsøk dag 7**

Ristekolbeforsøket ble avsluttet. Det ble tatt av 1 ml til DNA- analyse og 1 ml til bakterieoppbevaring på glyserolampuller fra vannfasen til hver ristekolbe, som tidligere beskrevet (ristekolbeforsøk 1, dag 1, kapittel 3.5.2, side 13). Det ble tatt bilde av ristekolbene og vannfasen i ristekolbene ble mikroskopert.

### 3.6. Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 2

Ristekolbeforsøk nr. 2 ble utført for å sjekke inokulumets evne til å biokonvertere oljen sammen med løsemiddelblandingen. Innhold i ristekolbene er oppført i tabell 5 og i vedlegg E, tabell E-1, side 92. Totalvolum olje var 5 gram per 50 ml væskefase i kolben.

Beregnet mengde løsemiddel ble tilsatt fra 5 - 50 % av totalvolumet olje (se tabell 6).

Ristekolbeforsøk 2: Negativ kontroll viser hvordan oljen reagerer på varme, risting og mineralmediet (MMAcYE), Prøve 1 viser hvordan oljen reagerer på mineralmedium (MMAcYE), varme og risting kombinert med inokulum uten tilsats av løsemiddel, prøve 2- 5 viser hvordan oljen reagerer på mineralmedium (MMAcYE), varme og risting kombinert med inokulum og ulike konsentrasjoner av løsemiddel.

**Tabell 5: Innhold ristekolber, ristekolbeforsøk 2**

Tabellen viser tilsetning i respektive ristekolber. Merk at inokulum ML og L004 tilsettes i hver sine kolber. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

Prøver	Tilsatt løsemiddel (%)	Tilsatt løsemiddel (ml)	Tilsatt inokulum (ml) OD=1	Tilsatt olje (g)	Tilsatt mineralmedium (ml)
Negativ kontroll #	0	0,00	0,00	5,00	50,00
Prøve 1 (0 % løsemiddel)	0	0,00	1,00	5,00	49,00
Prøve 2 (5 % løsemiddel)	5	0,25	1,00	5,00	48,75
Prøve 3 (15 % løsemiddel)	15	0,75	1,00	5,00	48,25
Prøve 4 (30 % løsemiddel)	30	1,50	1,00	5,00	47,50
Prøve 5 (50 % løsemiddel)	50	2,50	1,00	5,00	46,50

**Tabell 6: Totalvolum løsemiddel**

Tabellen viser totalvolum løsemiddel som tilsettes i respektive kolber per 5 gram olje, i ml og prosent (%).

Prøver	Tilsatt Olje (g)	Tilsatt løsemiddel (ml)	Tilsatt løsemiddel (%)
Negativ kontroll	0,00	0,00	0,00
Prøve 1 (0 % løsemiddel)	0,00	0,00	0,00
Prøve 2 (5 % løsemiddel)	5,00	0,25	5,00
Prøve 3 (15 % løsemiddel)	5,00	0,75	15,00
Prøve 4 (30 % løsemiddel)	5,00	1,50	30,00
Prøve 5 (50 % løsemiddel)	5,00	2,50	50,00

Ristekolbeforsøket ble utført på samme måte som beskrevet i ristekolbeforsøk 1 (Kapittel 3.5, side 13) med noen endringer:

- a) I dette forsøket ble det tilsatt olje. Det ble tilsatt 2 % olje (1 g) dag 1 for å indusere inokulumet med oljen (vedlegg F, tabell F-2, side 94).
  
- b) Dag 3 ble resterende mengde olje (4 g) tilsatt i respektive kolber (vedlegg F-2, side 94).
  
- c) Etter endt ristekolbeforsøk ble olje og vannfasen skilt ved hjelp av en skilletrakt. Diklormetan (DCM, HPLC grad, LabScan) ble tilsatt i ristekolbene og dette ble helt over i skilletrakten. Vannfasen la seg øverst og oljen ble skilt ut i forhåndsveide begerglass (se vedlegg F-3, side 95). Olje og DCM var nå bestanddelen i løsningen og dette sto til avdamping i 5 dager slik at oljen var eneste bestanddel i begerglassene.
  
- d) Oljekonsentrasjonen ble beregnet ut fra veid gram olje og fortynnet til 1 mg/ml (vedlegg F-3, side 95) til elektropray ioniserende massespektrometri (ESI-MS) analysering.  
Analysene med ESI-MS ble utført av Gunnhild Neverdal, Forsker ved Statoils Forskningscenter i Trondheim.
  
- e) DNA ble ekstrahert ved hjelp av FastDNA<sup>®</sup> SPINKit for Soil (se vedlegg G, side 97)



### 3.7. Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 3

Ristekolbeforsøk 3 ble gjort for

- å sjekke hvilken påvirkning løsemiddelblandingen alene hadde på tilsatt olje, og samtidig
- reprodusere resultat fra ristekolbeforsøk 2. Ved reproduksjonen ble det brukt nedfrosset inokulum fra ristekolbeforsøk 2.

#### Ristekolbeforsøk 3:

Negativ kontroll 1 og 2 viser hvordan oljen reagerer på de ulike temperaturene (60 °C/35 °C), risting og mineralmediet (MMAcYE). Negativ kontroll 3 er tatt med for å utelukke kontaminering og inneholder kun mineralmedium (MMAcYE).

Prøve 1 og 2 viser hvordan oljen reagerer på ulike konsentrasjoner av løsemiddel. Prøve 4 og 5 viser hvordan oljen reagerer på inokulumet og ulike konsentrasjoner av løsemiddel.

Innhold i ristekolbene er vist i tabell 7 og vedlegg H (tabell H-1, side 98), gir en oversikt over hvilke parameter som er tatt med i ristekolbeforsøket. Totalvolum olje var 5 gram per 50 ml væskefase i kolben. Beregnet mengde løsemiddel ble tilsatt fra 5 - 50 % av totalvolumet olje (se tabell 6).

#### **Tabell 7: Innhold ristekolber, ristekolbeforsøk 3**

Tabellen viser tilsetning i respektive ristekolber. Merk at inokulum ML og L004 tilsettes i hver sine kolber. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

<i>Prøver</i>	<i>Tilsatt løsemid del (%)</i>	<i>Tilsatt løsemiddel (ml)</i>	<i>Tilsatt inokulum (ml) OD=1</i>	<i>Tilsatt olje (g)</i>	<i>Tilsatt mineralmedium (ml)</i>
Negativ kontroll 1 #	0,00	0,00	0,00	5,00	50,00
Negativ kontroll 2 #	0,00	0,00	0,00	5,00	50,00
Negativ kontroll 3 #	0,00	0,00	0,00	0,00	50,00
Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	5,00	0,25	0,00	5,00	49,75
Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	50,00	2,50	0,00	5,00	47,50
Prøve 3 (5 % løsemiddel m/inokulum)	5,00	0,25	1,00	5,00	48,75
Prøve 4 (50 % løsemiddel m/inokulum)	50,00	2,50	1,00	5,00	46,50

Ristekolbeforsøket ble utført på samme måte som beskrevet i ristekolbeforsøk 1 (Kapittel 3.5, side 13) med noen endringer:

- a) Inokulumet i dette ristekolbeforsøket ble tatt fra nedfrost reinokulert inokulum fra ristekolbeforsøk 2 (nevnt i kapittel 3.5.2, side 13). (Oppdyrking fra originalplate krever robot og denne var utilgjengelig i denne perioden).

Dette kan gi et annet resultat enn tidligere men ble likevel tatt med som en kontroll på om glyserolnedfrysningen klarer å bevare mikroorganismene ved å gi samme resultat som tidligere. Inokulatene (ML og L004) fryst ned på glyserol, ble tint og tilsatt i hver sin kolbe (250ml) som var tilsatt 50 ml MMAcYE.

Kolbene ble satt til inkubering i risteinkubator (Multitron) ved 60 °C (L004) og 35 °C (ML), 110 RPM og 54 % fuktighet i 1 døgn.

- b) Dag 1 ble det tatt ut 200 µl fra kolbene og OD<sub>660nm</sub> ble målt. Det ble funnet tilstrekkelig vekst (vedlegg M, side 118).
- c) Ristekolbene ble tilsatt medium (MMAcYE), inokulum, løsemiddel og 2 % olje (1 g) (vedlegg H, tabell H-1, side 98) dag 1 i sine respektive kolber. Tilsatt olje er vist i vedlegg H, tabell H-2, side 99.
- d) Dag 3 ble resterende mengde olje (4 g) tilsatt i respektive kolber (vedlegg H, tabell H-2, side 99).
- e) Olje og vannfasen ble skilt og avdampet som beskrevet i kapittel 3.6 (ristekolbeforsøk 2, punkt c, side 16).
- f) Oljekonsentrasjonen ble beregnet ut fra veid gram olje og fortynnet til 1 mg/ml (vedlegg H, tabell H-3-1 og H-3-2, side 100 og 101) til ESI-MS. Analysene med ESI-MS ble utført av Gunnhild Neverdal, Forsker ved Statoils Forskningscenter i Trondheim.
- g) DNA ble ekstrahert ved hjelp av FastDNA<sup>®</sup> SPINKit for Soil (se vedlegg G, side 97)

### 3.8. Etterarbeid ristekolbeforsøk:

#### 3.8.1. Bilder av ristekolbene

Det ble tatt bilder av ristekolbene etter endt ristekolbeforsøk. Dette ble gjort for å se om det hadde skjedd en visuell endring i vannfasen med tanke på vekst av mikroorganismer (ristekolbeforsøk 1) og hvordan olje- og vannfasen til kolbene hadde fordelt seg (ristekolbeforsøk 2 og 3). Kolbene med olje ble gradert på en skala fra 0 (negativ) til 4+, basert på oljens sammensetning som vist i tabell 8. Bilder av graderingen er vist i figur 6.

#### **Tabell 8: Gradering av oljesammensetning**

Tabellen viser hvordan oljen er gradert på en skala fra negativ til 4 +, med en beskrivelse av visuell gradering.

<b>Gradering</b>	<b>Beskrivelse</b>
Negativ	Oljeflak over vannfasen
1 +	Litt oppdeling i oljeflakene
2 +	Svært oppdelt olje, klumper
3 + /4 +	Emulgert i vannfasen



**Figur 6: Gradering av olje**

Figuren viser hvordan ristekolbene er gradert visuelt. Fra høyre: negativ, 1 +, 2 + og 3 + /4 + med tilhørende beskrivelse av graderingen oppgitt i tabell 4.

#### 3.8.2. Mikroskopi av vannfasen til ristekolbene:

En prøve fra væskefasen til ristekolbene ble mikroskopert ved endt ristekolbeforsøk for å se om det var vekst av mikroorganismer i kolbene og om en eventuell kvantitativ forskjell kunne synes. Mikroskopet som ble brukt var Axiophot Zeiss (Carl Zeiss) med et 20 x objektiv (Plan-NEOFLUAR, Carl Zeiss).

### **3.8.3. DNA-isolering og måling av DNA- produkt isolert fra vannfasen**

For å få en indikasjon på ulikheter mellom biodiversiteten til inokulum tilsatt i ristekolbeforsøkene dag 1, 3 og etter endt ristekolbeforsøk, ble det tatt ut prøver fra vannfasen.

1 ml fra vannfasen til alle prøvene ble sentrifugert til en pellet (Eppendorf 5430 R; 14000 RPM i 20 min) og DNA ble ekstrahert fra disse prøvene ved hjelp av to forskjellige kommersielle kit.

Disse var DNeasy Blood & Tissue Kit (Kat.nr. 69506, Qiagen) og FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil (Kat. nr. 11-6560-200, MP Biomedicals).

DNA prøvene fra ristekolbeforsøk 1 ble ekstrahert ved hjelp av DNeasy<sup>®</sup> Blood and Tissue kit. DNA prøvene fra ristekolbeforsøk 2 ble ekstrahert ved hjelp av FastDNA<sup>®</sup> SPINKit for Soil.

DNeasy Blood & Tissue Kit ble brukt i ristekolbeforsøk 1 fordi det isolerer DNA fra bakterieprøver og FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil ble brukt i ristekolbeforsøk 2 og 3 fordi kippet isolerer DNA fra prøver det er vanskelig å få DNA fra, som for eksempel olje og sandprøver. Fremgangsmåten for DNeasy Blood & Tissue Kit er beskrevet i vedlegg I, side 102 og FastDNA<sup>®</sup> SPIN Kit for Soil er beskrevet i vedlegg G, side 97.

Mengde og renhet av DNA i prøvene ble bestemt ved hjelp av NanoDrop<sup>®</sup> Spektrofotometer (260/280 nm, ND – 1000, Thermo Fisher Scientific Inc) for å sjekke at DNA-isoleringen ble vellykket. Vurdering av renheten til DNA ble basert på ratioen (A260/A280 og A260/230). Rent DNA har en A260/A280 ratio på 1,8. Ratio under 1,8 indikerer tilstedeværelse av proteiner som absorberer UV-lys ved 280 nm på grunn av aromatene i tryptofan, eller andre kontaminanter som absorberer sterkt ved, eller nært, 280 nm. Ratio over 1,8 indikerer tilstedeværelse av RNA som absorberer UV lys ved 260 nm. En sekundær beregning av DNAets renhet ble gjort ved å måle absorbans ved 230 nm for så å kalkulere A260/A230 ratio. Disse verdiene er ofte høyere enn A260/A280 verdiene og ligger vanligvis mellom 2,0-2,2. Om ratioen er lavere kan dette indikere tilstedeværelse av kontaminanter som absorberer ved 230 nm. Den generelt aksepterte ratioen på 1,8 er en tommelfingerregel, den aktuelle ratioen avhenger av strukturen til nukleinsyrene.<sup>17</sup>

### **3.8.4. Polymerase Chain Reaction (PCR) amplifisering**

16S rRNA-genet til mikroorganismene ble amplifisert fra DNA isolert fra vannfasen ved hjelp av polymerase chain reaction (PCR).

Slektskap mellom bakterier kan påvises ved DNA-homologi. To bakteriearter er nært beslektet dersom de har likt arvemateriale. For å analysere DNA-homologi hos bakterier brukes sammenligning av DNA-sekvenser av genet som koder for 16S-delen av bakterieribosomet. 16S rRNA-genet er et housekeeping-gen som brukes som markør for å studere bakteriell fylogeni, blant annet fordi det er tilstede i nesten alle bakterier og siden funksjonen til 16S rRNA-genet ikke har forandret seg over tid.<sup>18</sup>

I teknikken denaturerende gradient gel elektroforese (DGGE) utnyttes ulikheter i 16S rRNA-sekvensen til forskjellige bakteriearter. Mange bånd på en DGGE-gel representerer mange ulike arter i blandingen. En oversikt over PCR-metodene som ble brukt i denne oppgaven er vist i tabell 9.

#### **Tabell 9: PCR-metoder**

Tabellen viser en oversikt over PCR-metoder som ble brukt i oppgaven, hva metoden gir svar på, primerne og forventet basepar på gelen. Merk at PCR 2.trinn Archaea kun blir brukt dersom det blir funnet produkt i trinn 1.

<b>Metode</b>	<b>Mål</b>	<b>Forward primer</b>	<b>Reverse primer</b>	<b>Basepar</b>
PCR Bakterier	Produktsjekk på bakterier etter DNA-isolering	341 f Bac	907 r Bac	566
DGGE Bakterier	Undersøke biodiversitet	341 f Bac clamp	907 r Bac	606
PCR 1.tr. Archaea	Produktsjekk på archaea etter DNA-isolering	Arch 20 f mod	Arch 958 r mod	938
PCR 2.tr. Archaea	Undersøke biodiversitet	PARCH 340clamp f	PARCH 519 r	193

### **3.8.5. 16S rRNA PCR av isolert DNA for produksjekk av bakterier**

PCR-produkt ble syntetisert med 16S rRNA primere 341 f Bac og 907 r Bac for å sjekke om DNA-isoleringen ble vellykket med funn av produkt. For å amplifisere ønsket DNA tråd ble det først laget en mastermix som videre ble blandet med DNA isolert fra prøvene. Denne mastermixen inneholder primere som er komplementær med templatet, enzymet DNA polymerase (HotStarTaq Polymerase, Qiagen), deoxynukleotid trifosfater (dNTP) og PCR buffer som inneholder magnesium. Ved tillaging av mastermix (se tabell 10), ble det benyttet PCR-kit (Qiagen). DNA ladder (Invitrogen) ble brukt størrelsesmarkør.

#### **Tabell 10: Mastermix PCR Bakterie**

Tabellen beskriver hva som tilsettes i mastermix før den blandes med DNA-produkt. Volumet er oppgitt per prøve som skal amplifiseres.

<b>Reagens</b>	<b>Volum (<math>\mu</math>l)</b>
PCR buffer	5,00 $\mu$ l
dNTP (10mM)	1,00 $\mu$ l
Primer F (50 $\mu$ M)	0,50 $\mu$ l
Primer R (50 $\mu$ M)	0,50 $\mu$ l
HotStarTaq Polymerase	0,25 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	37,75 $\mu$ l
Total volum	45,00 $\mu$ l

Det ble laget et mastermix/templat forhold slik at total konsentrasjon av templat ble forhøyet. Det vil si at det i hvert rør ble tilsatt 45  $\mu$ l mastermix og 5  $\mu$ l templat, dette ble gjort fordi tidligere erfaringer har vist at det ikke dannes produkt i disse typer prøver ved tilsats av 48  $\mu$ l mastermix og 2  $\mu$ l templat (som det normalt brukes) ved lave DNA-konsentrasjoner.<sup>16</sup> En negativ kontroll ble tilsatt 45  $\mu$ l mastermix og 5  $\mu$ l MGW (Molecular Grade Water, DNase og RNase fritt vann). Prøvene ble kjørt på PCR- maskin (Thermo cycler, Eppendorf) i 30 sykluser med programmet Hotstart Regular (2 timer og 50 min, tabell 11).

#### **Tabell 11: PCR programmet Hotstart Regular.**

Tabellen beskriver hva som skjer med DNA i de ulike trinnene og ved hvilken temperatur og hvilken tid det aktuelle trinnet bruker. Trinn 2-4 repeteres 30 ganger.

<b>Trinn</b>	<b>Temperatur (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Tid (min)</b>
1: Denaturering	95	5
2: Denaturering	95	1
3: Primerbinding	55	1
4: Elongering	72	3
5: Elongering	72	7
6: Avkjøling	4	$\infty$

### **3.8.6. 16S rRNA PCR av isolert DNA for produksjekk av archaea**

PCR-produkt syntetisert med 16S rRNA primere Arch 20 f mod og Arch 958 r mod ble brukt for å undersøke om det fantes archaeastammer i prøvene. Ved tillaging av mastermix for archaea (tabell 12) ble det brukt PCR-kit (Qiagen) og DNA ladder (Invitrogen) ble brukt som størrelsesmarkør.

#### **Tabell 12: Mastermix PCR Archaea**

Tabellen beskriver hva som tilsettes i mastermix før den blandes med DNA-produkt. Volumet er oppgitt per prøve som skal amplifiseres.

<b>Reagens</b>	<b>Volum (<math>\mu</math>l)</b>
PCR buffer	5,00
dNTP (10mM)	1,00
Primer F (50 $\mu$ M)	0,50
Primer R (50 $\mu$ M)	0,50
HotStarTaq Polymerase	0,25
Bovine Serum Albumin (BSA)	2,50
dH <sub>2</sub> O	38,25
Total volum	48,00

45  $\mu$ l mastermix ble blandet med 5  $\mu$ l templat. En negativ kontroll ble tilsatt 45  $\mu$ l mastermix og 5  $\mu$ l MGW. Prøvene ble kjørt på PCR- maskin i 30 sykluser med programmet Regular (2 timer og 50 min, tabell 13).

#### **Tabell 13: PCR programmet Regular**

Tabellen beskriver hva som skjer med DNA i de ulike trinnene og ved hvilken temperatur og tid det aktuelle trinnet bruker. Trinn 2-4 repeteres 30 ganger.

<b>Trinn</b>	<b>Temperatur (<math>^{\circ}</math>C)</b>	<b>Tid (min)</b>
1: Denaturering	95	4
2: Denaturering	95	1
3: Primerbinding	55	1
4: Elongering	72	3
5: Elongering	72	7
6: Avkjøling	4	$\infty$

### **3.8.7. Produktsjekk av 16S rRNA PCR-produkt (bakterie og archaea) med agarosegelelektroforese**

For å undersøke kvaliteten til PCR-produktene ble prøvene undersøkt ved agarosegelelektroforese. En agaroseløsning (1,25 %) ble laget ved å smelte agarose (2,5 g, Carl ROTH) i bufferløsning (0,5 x TBE, 5 prime VWR). Agarosegel ble støpt med brønnekammer og fargestoffet SybrSafe DNA gel stain (10µl, Invitrogen Molecular Probes) ble tilsatt. Deretter ble gelen avkjølt og karet fylt med buffer (0,5 TBE) slik at buffer dekket agarosegelen. PCR produkt (10 µl) og DNA ladder (4 µl, Invitrogen) ble tilsatt loadingbuffer (3 µl, Promega). Av dette ble 13 µl fra prøvene og 7 µl ladder tilsatt i brønnene. Spenningen ble tilført gelen og etter 90 minutter ble elektroforesen stoppet og PCR bånd i gelen visualisert med UV-lys i Gel-Doc (Syngene)

### **3.8.8. Karakterisering av biodiversitet ved PCR/DGGE**

DGGE er en teknikk som separerer DNA-molekyler på basepar i en polyakrylamidgel. Teknikken kombinerer gelelektroforese med DNA-denaturering av DNA fragmenter som ofte er produsert ved PCR. Miljøet etableres ved en kombinasjon av temperatur på 60 °C og en gel med lineær denaturerende gradient av urea og formamid.

Dobbeltrådet DNA utsettes for økende denaturerende forhold og vil smelte i segmenter kalt smeltemener. Teknikken utnytter ulikheten i stabilitet av G-C paring i forhold til A-T paring. DNA fragmenter som har høyere antall G-C par er mer stabile fordi de har tre hydrogenbindinger mellom seg og forblir dobbeltrådet lengre enn A-T par som har to hydrogenbindinger mellom seg. Når DNA når sin spesifikke smeltetemperatur i polyakrylamidgelen, vil DNA-molekylet splittes delvis opp. Dette fører til at migrasjonshastigheten avtar kraftig fordi DNA-fragmentene åpnes til strukturer som bli fanget i nettverket i gelen. På denne måten vil DNA fragmenter med forskjellige sekvenser vandre ulikt. Siden smeltetemperaturen til hvert smeltemener er sekvensspesifikk, vil smelteprofilen til DNAet fra bakterier med en enkelt forskjell i baseparsekvens vises, og man kan si at det er forskjellige bakteriearter som er tilstede i en bakterieløsning. Hvert bånd som dannes i gelen tilsvarer en art og i oppgaven blir dette brukt for å prøve å si noe om biodiversiteten i prøvene.<sup>17</sup>

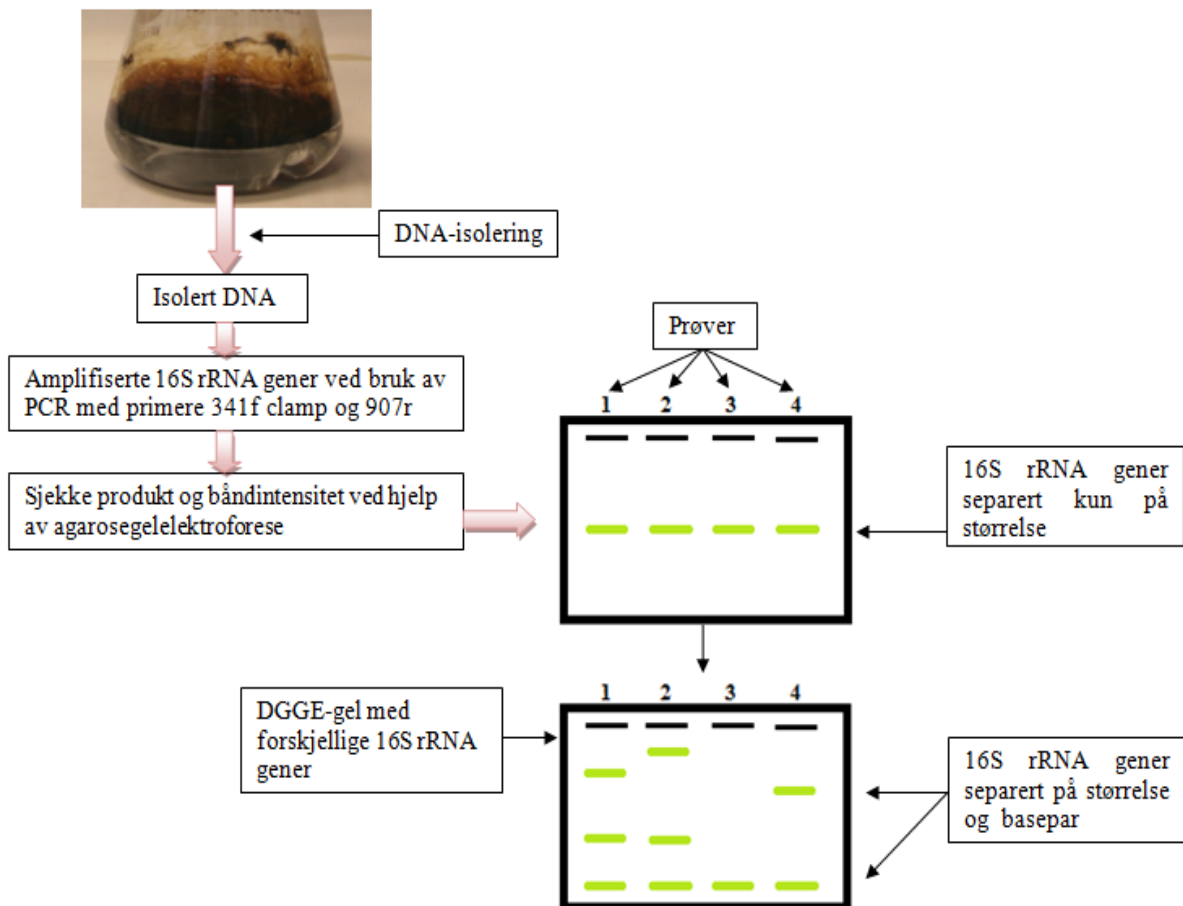


### 3.8.9. Amplifisering av DNA-produkt til DGGE med PCR

Før DGGE-analysen kjøres PCR-produktene på en agarosegel for å sjekke om det er produkt og hvor mye produkt det er (hvor sterkt båndet er). Dette brukes videre for å bestemme mengde PCR-produkt som skal tilsettes DGGE-gelen. (Dersom det er svake bånd skal det tilsettes 10 µl templat og 10 µl loadingbuffer, ved sterke bånd tilsettes det 15 µl templat og 5 µl loadingbuffer på DGGE-gelen.)

Gangen fra prøvetaking til agarosegel og DGGE er visualisert i figur 7.

Mastermix ble laget med samme reagenser som i 16S rRNA bakterie PCR (tabell 10), men med 16S rRNA primere 341f clamp og 907r. Primere som inneholder clamp benyttes da de hindrer fullstendig denaturering av DNA-fragmentene i prøvene på polyakrylamidgelen. PCR programmet Hotstart Regular (tabell 11) ble brukt og samme mastermix/templat forhold og lader som beskrevet under kapittel 3.8.5, side 22.



**Figur 7: Analyse av DNA fra ristekolbene ved hjelp av Denaturerende Gradient Gel elektroforese (DGGE). Fra et totalsamfunn med DNA i vannfasen isoleres DNA og genene amplifiseres ved bruk av primere 341f clamp og 907r. Inspirert av: Madigan, 2009.<sup>19</sup>**

Ved produksjon av DGGE-gel ble to 6 % (w/v) akrylamidløsninger (Carl ROTH) laget med henholdsvis 70 % og 20 % urea (Fluka) og formamid (BDH Laboratory supplies) (vedlegg J, kapittel J-1, side 104). En gelsandwich ble satt sammen av to glassplater, spacers og en støpeform. Et gradientsystem (Model 475, Bio-Rad Laboratories Inc) ble brukt for å danne en gradient av de to akrylamidløsninger mellom to glassplater. Brønnkammer ble satt inn og gelen ble pakket inn i plast for å forhindre uttørking. Gelen ble satt over natten for stivning. Gelkaret (DCODE™ Universal Mutation System, BioRad) ble fylt med 1x TAE (7 L, (40 mM Tris-Acetate, pH 7.5; 20 mM acetate, 1 mM EDTA, Eppendorf)

Gelkaret som var fylt med 7 L 1 x TAE buffer ble varmet opp til 60 °C.

350 ml 1x TAE buffer ble tatt ut fra gel beholderen. Brønnkam ble tatt ut fra gelen og gelen ble montert i gel holder. Gelholderen ble plassert i beholderen og buffer ble tilsatt igjen over gelen. Brønnene ble vasket med 1x TAE buffer og prøvene ble påsatt gelen. PCR produkt (10-15 µl) med DNA loadingbuffer (5 - 10 µl, 5 PRIME) ble tilsatt ut fra anslått båndintensitet. DNA mass Ladder (1 µl, Invitrogen) ble blandet med (10x) DNA loadingbuffer (19 µl, 5 PRIME). Gelen ble tilkoblet til en elektroforator og kjørt i fire timer og femten minutt ved 130 V.

Etter dette ble gelen farget i fargebad med SYBR Gold nucleic acid stain (Invitrogen) i 40 min, og det ble tatt bilde av gelen i GelDoc (Syngene).

### 3.8.10. Oljekarakterisering (ristekolbeforsøk 2 og 3) – Elektrospray ioniserende massespektrometri (ESI-MS):

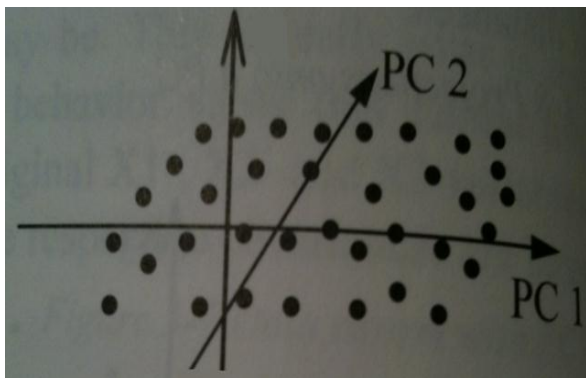
Målemetoden brukt i denne oppgaven var kjemisk "fingerprinting" av oljeprodukt skilt fra vannfasen i ristekolbeforsøk 2 og 3, basert på elektrospray massespektrometri (ESI-MS). Metoden er basert på full-scann positiv og negativ ESI-MS ved bruk av et "singel quadrupole" ESI-MS instrument, men med direkte injeksjon (uten kromatografisk separasjon) og uten fragmentering av molekylene.

Analysen ble utført på maskinen Agilent Quadrupole G1956B (Agilent Technologies Inc). Metoden ble utført i "scann modus" med massetall ( $m/z$ ) verdi mellom 65 til 1400 og gav spekter med en distinkt linje per hele massetall.

Mobilfasen var acetonitril (tilsatt 5 % toluen) og ammoniumnitrat (50 mM) i en 90:10 blanding. Mobilfaseflow var 0,2 ml/min og fragmentorspenningen var 100 V.

1  $\mu$ l fra hver prøve ble injisert av en auto sampler og analysert 4 ganger. Mønsterkjennelse av spektra ble utført ved bruk av et multivariat data analysesystem (Simca-P+ 12.1, Umetrics). Likheter og forskjeller mellom spektra ble evaluert ved hjelp av prinsipalkomponent analyse (PCA).

Gjennomsnitt av spektra (analysert 4 ganger) ble utregnet. Fratrekk av bakgrunn og utforming av spektra ble utført med en makro for å forsikre identiske data fra parallellene til prøvene. Hvert gjennomsnitts spekter ble ordnet i tabellform til en rad med nummer hvor hvert nummer representerer høyden av hver spekterlinje. Oppløsningen av ESI-MS gir  $m/z$  verdier med en desimal.<sup>20</sup> Før multivariat analysen ble spektralinjene normalisert til en spesifikk sum i hver rad (utført i Microsoft Excel). Matrisen ble overført til Simca-P+ 12 og de normaliserte data ble gjennomsnittsberegnet. PCA ble brukt til å evaluere likheter og forskjeller mellom spektra.



PCA gir et "score plott" med prinsipalkomponent 1 (PC1) som viser den maksimale variasjonen mellom prøvene på X-aksen. Y-aksen viser prinsipalkomponent 2 (PC2) "diagonalt" for den første prinsipalkomponenten og viser nest største variasjon i prøvene.<sup>21</sup> (vist i figur 8)

**Figur 8: Prinsipalkomponent analyse (PCA)**  
PC1 som viser maksimal varians mellom prøvene og PC2 som viser nest største variasjon i prøvene. Inspirert av Esbensen (1996)<sup>23</sup>

Analysene ble utført av Gunnhild Neverdal, forsker, ved Statoils Forskningscenter i Trondheim. Spørsmål om detaljert beskrivelse rundt analysen kan rettes til Ingvar Eide, Forsker, Statoil ASA.

Metoden brukes til å undersøke sammensetningen i oljen etter endt ristekolbeforsøk og hvordan de ulike prøveparameterne påvirker oljen i forhold til nativ olje (ubehandlet olje), da metoden kan vise at en endring har funnet sted i oljesammensetningen på molekylnivå.

## 4. Resultater

### 4.1. Ristekolbeforsøk 1:

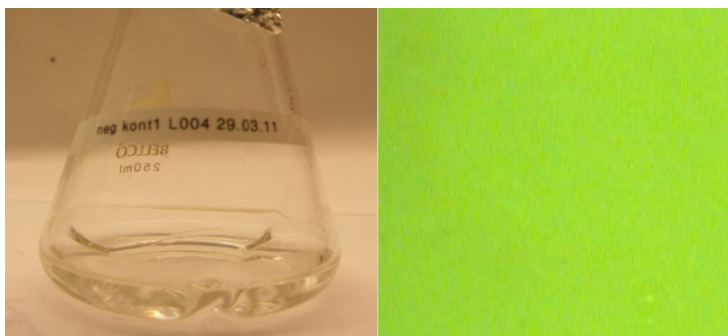
Ristekolbeforsøk 1 ble utført for å studere effekten løsemiddelet har på inokulumet.

#### 4.1.1. OD-måling av inokulum før og etter reinokulering

OD-verdier fra L004 og ML fra originalplater til reinokulerte plater viser generelt en god vekst av mikroorganismer ( $>0,05$  OD) og ble godkjent for videre bruk (vedlegg D, side 89). Det endelige inokulum som ble tilsatt hadde en OD-verdi på 1,11 for L004 og 1,10 for ML.

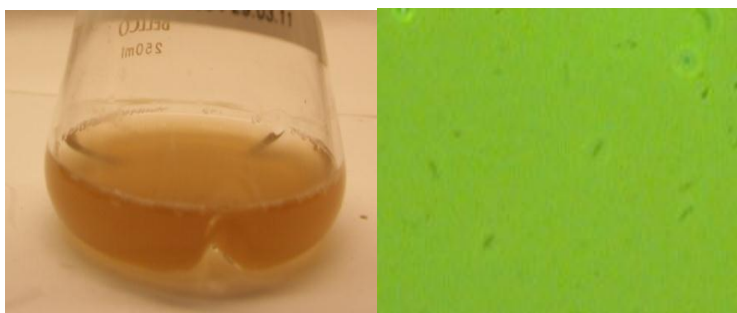
#### 4.1.2. Bilder av ristekolber og mikroskopi av vannfase

Det ble tatt bilder av ristekolbene og vannfasen ble mikroskopert ved endt ristekolbeforsøk. Prøvene ble mikroskopert for å prøve å gi en indikasjon på ulikhet i vekst av mikroorganismene ved de forskjellige løsemiddelkonsentrasjonene. Bildene og mikroskopibildene til inokulum L004 er vist i figur 9 til 14, bildene fra ristekolbene med inokulum ML er vist i vedlegg K, kapittel K-1, side 105.



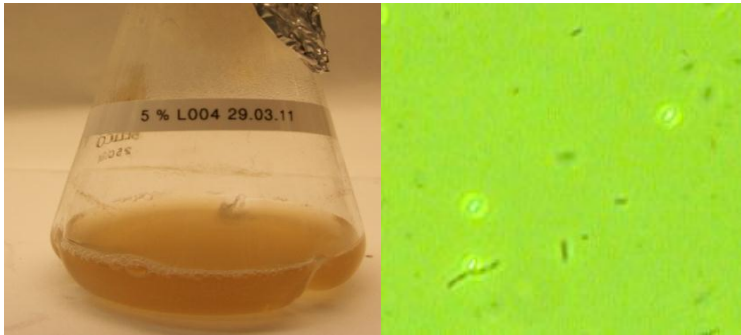
**Figur 9: Negativ kontroll, L004, dag 7 - ristekolbeforsøk 1**

Kolben inneholder kun mineralmedium (MMAcYE). Det vises ingen blakking i vannfasen og mikroskopibildet viser ingen tegn til vekst av mikroorganismer.



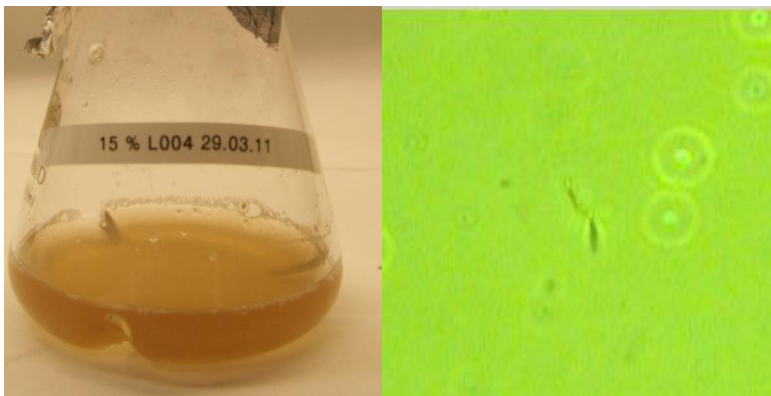
**Figur 10: Prøve 1, L004, dag 7 - forsøk 1.**

Kolben inneholder mineralmedium MMAcYE og inokulum. Det er blakking av vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer i vannfasen.



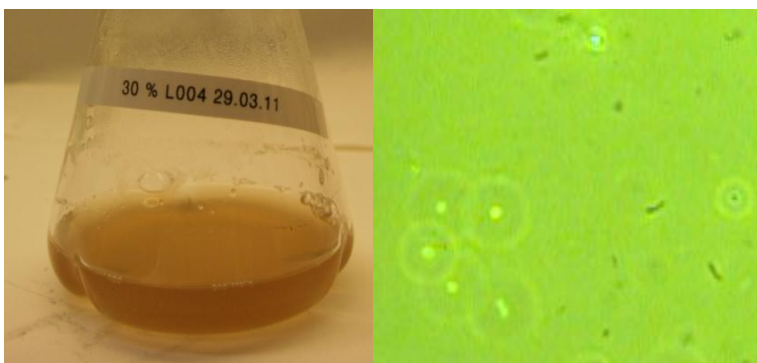
**Figur 11: Prøve 2, L004, dag 7 - forsøk 1.**

Kolben inneholder mineralmedium MMacYE, inokulum og 5 % løsemiddel. Det er blakking av vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer i vannfasen.



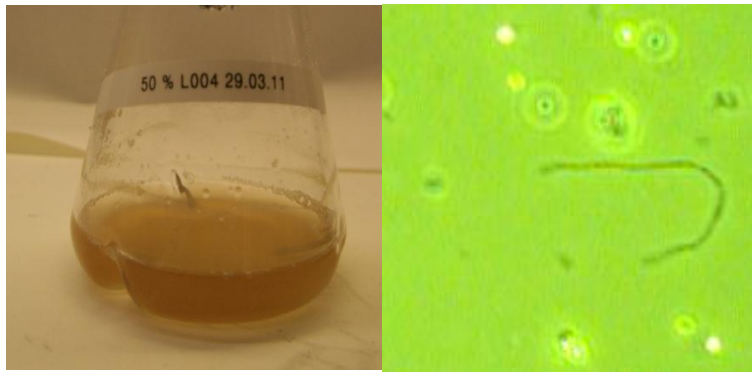
**Figur 11: Prøve 3, L004, dag 7 - forsøk 1.**

Kolben inneholder mineralmedium MMacYE, inokulum og 15 % løsemiddel. Det er blakking av vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer i vannfasen.



**Figur 13: Prøve 4, L004, dag 7 - forsøk 1.**

Kolben inneholder mineralmedium MMacYE, inokulum og 30 % løsemiddel. Det er blakking av vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer i vannfasen.



**Figur 14: Prøve 5, L004, dag 7 - forsøk 1.**

Kolben inneholder mineralmedium MMAcYE, inokulum og 50 % løsemiddel. Det er blakking av vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer i vannfasen.

Kolbene fra dag 7 (figur 8-13 og vedlegg K-1, figur K-1 til K-6, side 105) viser god mikrobevekst med både L004 og ML som inokulum, dette kan sees som blakking av vannfasen, det er vanskelig å si om økning av løsemiddel har hatt en positiv effekt på mikroorganismene i forhold til negativ kontroll.

#### **4.1.3. Måling av DNA-konsentrasjon fra DNA-isolering**

DNA-konsentrasjonene fra ristekolbeforsøk 1 var generelt lave (vedlegg K, kapittel K-2, side 108). A260/A280 ratioen viste varierende resultater både under og over 1,8. A260/A230 ratio viste også varierende resultater med ratio over og under 2,0-2,2. Dette vil si at DNA fra ristekolbeforsøk 1 var urent.

#### **4.1.4. Analyse av 16S rRNA PCR-produkt for produktsjekk av bakterie og archaea på agarosegel**

Agarosegel med PCR-produkt syntetisert med primerne 16S rRNA primere 341 f Bac og 907 r Bac ble kjørt for å sjekke om DNA-isoleringen ble vellykket. Det ble funnet produkt i DNA prøver isolert fra kolber tilsatt inokulum. Vedlegg K, kapittel K-3, side 110 viser agarosegelen for prøver tilsatt inokulum ML i ristekolbeforsøk 1. Ettersom disse gelene kun er et trinn for å sjekke produkt vil de ikke bli tatt med i videre resultatvurdering.

PCR med 16S rRNA primere Arch 20 f mod og Arch 958 r mod for archaea ble kjørt på en agarosegel. Det ble ikke funnet Archaea i ristekolbeforsøk 1.

#### 4.1.5. Analyse av 16S rRNA PCR-produkt med clamp på agarose- og DGGE gel

PCR-produkt til DGGE syntetisert med primerne 341 f Bac clamp og 907 r Bac ble kjørt på agarosegel for å sjekke produkt og båndintensitet til L004 og ML, som beskrevet i kapittel 3.8.9, side 25.

PCR-produkt ble så kjørt på DGGE for å få en indikasjon på biodiversiteten til mikroorganismene i DNA-prøvene:

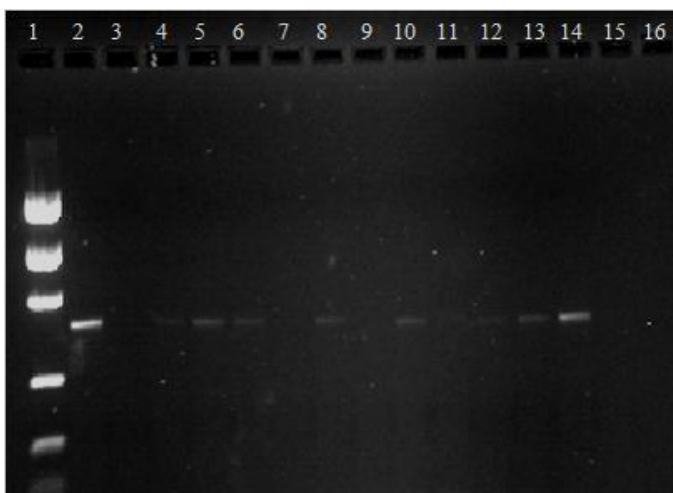
##### a) *Prøveserie med inokulum L004*

PCR-produktene fra DNA i vannfasen til prøveserien tilsatt inokulum L004, er vist i figur 15 med tilhørende prøve-ID i brønnoppsett i tabell 14. DGGE resultatene er vist i figur 16. Noen prøver som ble negative på agarosegelen er tatt med på DGGE gelen for å bekrefte at prøven er negativ (Negativ kontroll, dag 3 og reagenskontroll). Reagenskontrollen er tatt med for å utelukke kontaminering fra DNA-isoleringskit.

##### **Tabell 14: Brønnoppsett agarosegel 1, ristekolbeforsøk 1.**

*Prøvene er sortert på inokulum L004 og kronologisk for prøvetakningsdag. Merk at DNA-prøver fra vannfasen tatt dag 1 kun er tatt fra ristekolbe med prøve 1. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.*

Brønn	Prøve	Dag	Brønn	Prøve	Dag
1	Ladder		9	L004 Negativ kontroll #	7
2	L004 Prøve 1	1	10	L004 Prøve 1 (0 % løsemiddel)	7
3	L004 Negativ kontroll #	3	11	L004 Prøve 2 (5 % løsemiddel)	7
4	L004 Prøve 1 (0 % løsemiddel)	3	12	L004 Prøve 3 (15 % løsemiddel)	7
5	L004 Prøve 2 (5 % løsemiddel)	3	13	L004 Prøve 4 (30 % løsemiddel)	7
6	L004 Prøve 3 (15 % løsemiddel)	3	14	L004 Prøve 5 (50 % løsemiddel)	7
7	L004 Prøve 4 (30 % løsemiddel)	3	15	Blank	
8	L004 Prøve 5 (50 % løsemiddel)	3	16	Reagenskontroll #	



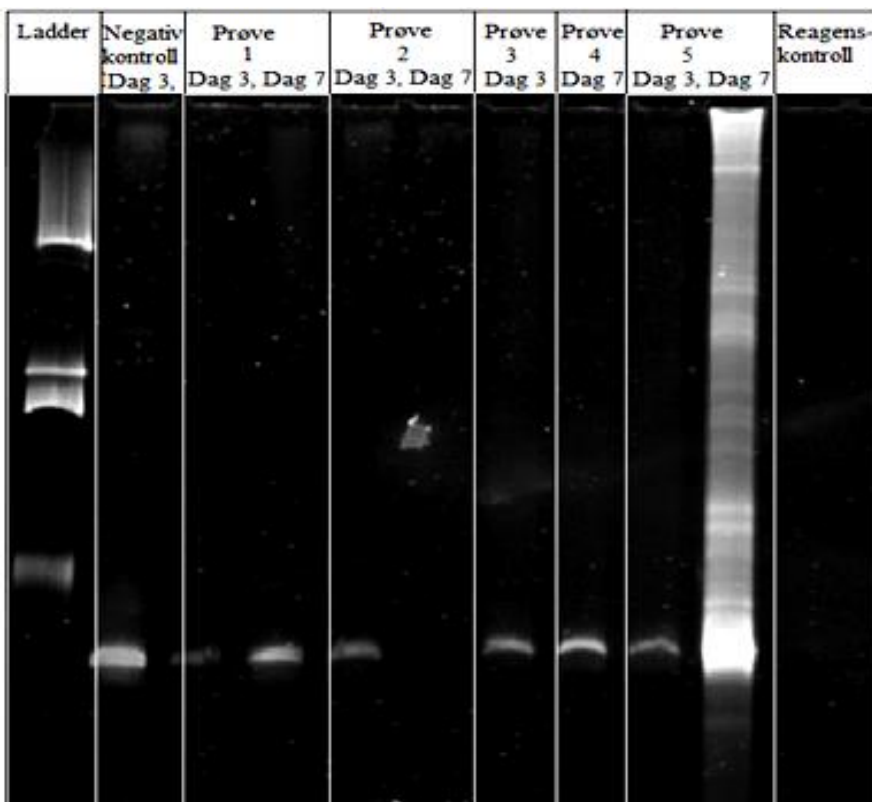
**Figur15: Agarosegel 1, forsøk 1, inokulum L004.** PCR utført med 16S rRNA primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. DNA ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøveoppsettet til brønnene er oppført i tabell 14.



Agarosegelen i figur 15 viser at alle prøvene hadde baseparlengde mellom 400 og 800 basepar og ligger på samme plass. Forventet baseparlengde med primerne 341 f Bac clamp og 907 r Bac er 606 basepar.

Det er svake bånd i alle prøvene bortsett fra i brønn 2 (Prøve 1, dag 1) og i brønn 14 (Prøve 5, dag 7) der båndene var sterkere. Negative kontroller ble negative som forventet.

De prøvene som ikke hadde bånd på agarosegelen ble ikke analysert med DGGE, men noen negative kontroller ble tatt med (negativ kontroll, dag 1). Det ble tilsatt maksimal mengde PCR-produkt (10 µl) i DGGE-brønnene siden båndene på agarosegelen generelt var svake for å øke mulighet for å få frem bånd.



**Figur 16: DGGE gel 1, forsøk 1, inokulum L004.**

PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac.

DNA-ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøve ID er merket over bildet.

DGGE-gelen vist i figur 16 viser antydning til høy biodiversitet i prøve 5, dag 7 (med inokulum og 50 % løsemiddelkonsentrasjon). Hvert bånd representerer 16S rRNA fra ulike arter. Det antas at resterende prøver som ble positive på agarosegelen, altså de som fikk bånd, hadde for svak konsentrasjon til å vises på DGGE. Båndene som oppstår nederst på gelen til de fleste prøvene antas å være rester av farge fra loadingbufferen.

**b) Prøveserie med inokulum ML**

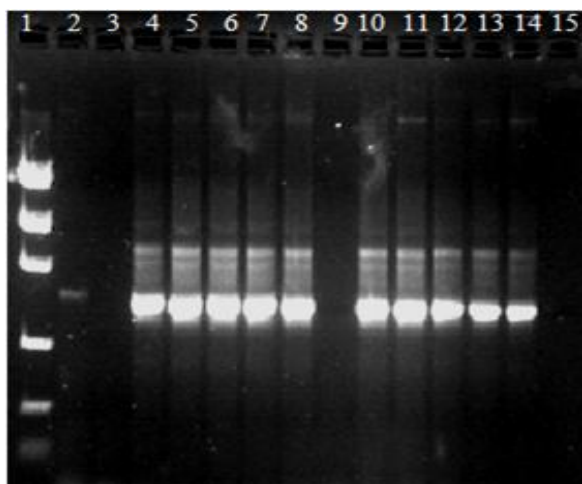
PCR resultatene fra DNA-produktene til prøveserien tilsatt inokulum ML er vist i figur 17 med tilhørende prøve-ID i tabell 15.

For å få en indikasjon på biodiversiteten til mikroorganismene i inokulumet ble PCR-produktene så kjørt på DGGE (figur 18). Noen prøver som ble negative på agarosegelen er tatt med på DGGE gelen for å bekrefte at prøven er negativ (negativ kontroll dag 3 og reagenskontroll). Reagenskontrollen er tatt med for å utelukke kontaminering fra DNA-isoleringskit.

**Tabell 15: Brønnoppsett agarosegel 2, ristekolbeforsøk 1.**

Prøvene er sortert på inokulum L004 og kronologisk for prøvetakningsdag. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

Brønn	Prøve	Dag	Brønn	Prøve	Dag
1	Ladder		9	ML Negativ kontroll #	7
2	ML Prøve 1	1	10	ML004 Prøve 1 (0 % løsemiddel)	7
3	ML Negativ kontroll #	3	11	ML004 Prøve 2 (5 % løsemiddel)	7
4	ML Prøve 1 (0 % løsemiddel)	3	12	ML004 Prøve 3 (15 % løsemiddel)	7
5	ML Prøve 2 (5 % løsemiddel)	3	13	ML004 Prøve 4 (30 % løsemiddel)	7
6	ML Prøve 3 (15 % løsemiddel)	3	14	ML004 Prøve 5 (50 % løsemiddel)	7
8	ML Prøve 5 (50 % løsemiddel)	3	15	Reagens kontroll #	



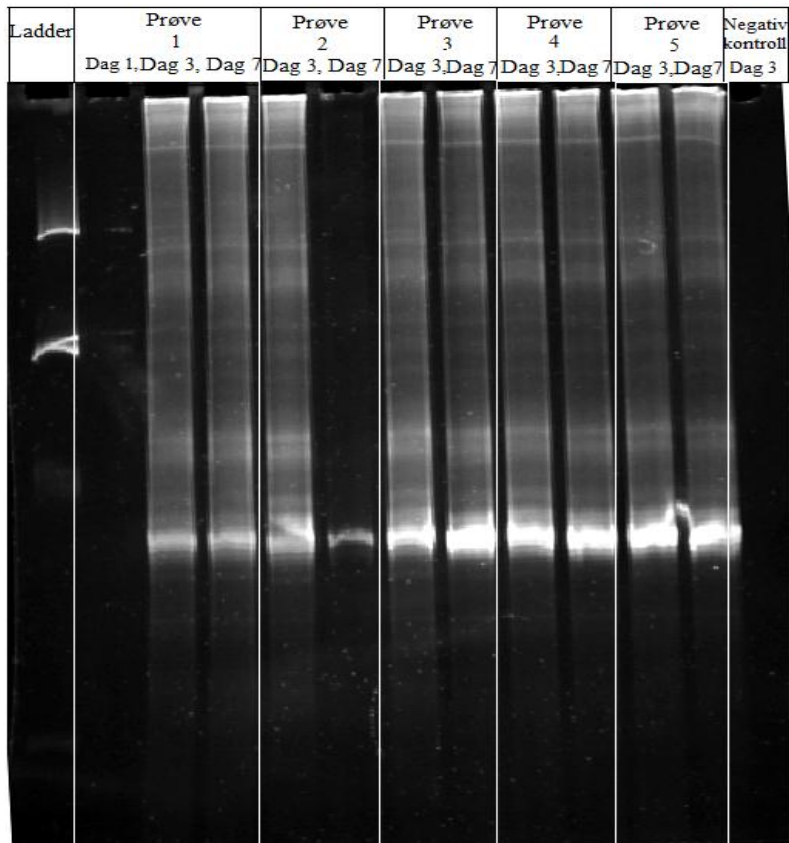
**Figur 17: Agarosegel 2, forsøk 1, inokulum ML.**

PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. DNA ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. DNA prøvene er oppført i tabell 15.

Agarosegelen vist i figur 17 viser at det er dannet noen spesifikke bånd, men det er sterkest bånd ved baseparlengde mellom 400 og 800 basepar og disse ligger på samme plass i alle prøvene. På agarosegelen ble det funnet sterke bånd i alle prøvene bortsett fra i brønn 2 (prøve 1, dag 1) og dette kan skyldes for lav DNA-konsentrasjon. Negative kontroller ble negativ som forventet.

Resultater -  
Ristekolbeforsøk 1

---



**Figur 18: DGGE gel 1, forsøk 1, inokulum ML.**  
PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac.  
DNA-ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør.  
Prøve ID er merket over bildet.

DGGE-gelen vist i figur 18 viser en tendens til likt biodiversitetsmønster ved de ulike løsemiddelkonsentrasjonene, bortsett fra i prøve 1, dag 1 med inokulum (ML) og i prøve 2, dag 7, med inokulum (ML) og 15 % løsemiddelkonsentrasjon. Det kan se ut til at inokulumet ML har god vekst med løsemiddelet. Biodiversiteten i prøve 1 uten tilsatt av løsemiddel og prøvene tilsatt økende mengder løsemiddel (prøve 2-5) er svært like, med unntak av prøve 2 som mangler bånd dag 7. Dette båndet kan være borte fordi det har skjedd en feil under analysen, det antas at det kunne ha vært gelrester i brønnen som forhindrer gelvandring av prøven.

#### 4.1.6. Samletabell for resultater, ristekolbeforsøk 1

En samletabell ble laget for å prøve å se resultatene fra de ulike analysemetodene i en sammenheng (tabell 16). Tabellen er basert på de ulike metodene og deres resultat.

**Tabell 16: Samletabell over resultater fra ristekolbeforsøk 1.**

Tabellen er basert på de ulike metodene og deres resultat. Positiv mikroskopi betyr funn av mikroorganismer i vannfasen. Positiv agarose- og DGGE gel betyr at det ble funnet bånd som tyder på biodiversitet. Prøver merket med (\*) betyr at prøvene ikke er kjørt på DGGE pga. negativt resultat på agarosegel som også ville blitt negative på DGGE- gel. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

<b>Forsøk 1, L004</b>	<b>Mikro- skopi</b>	<b>Agarosegel</b>		<b>DGGE</b>		<b>Kommentar</b>
		<b>Dag 3</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 3</b>	<b>Dag 7</b>	
Negativ kontroll (60 °C) #	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	*	Negativ som forventet
Prøve 1 (0 % løsemiddel)	Positiv	Svakt positiv	Svakt positiv	Negativ	Negativ	Negativ DGGE mulig grunnet for lav DNA konsentrasjon
Prøve 2 (5 % løsemiddel)	Positiv	Svakt positiv	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ DGGE mulig grunnet for lav DNA konsentrasjon
Prøve 3 (15 % løsemiddel)	Positiv	Svakt positiv	Negativ	Negativ	*	Negativ DGGE mulig grunnet for lav DNA konsentrasjon
Prøve 4 (30 % løsemiddel)	Positiv	Negativ	Svakt positiv	*	Negativ	Negativ DGGE mulig grunnet for lav DNA konsentrasjon
Prøve 5 (50 % løsemiddel)	Positiv	Svakt positiv	Positiv	Negativ	Positiv	Indikerer at løsemiddelkonsentrasjonen kan ha en positiv innvirkning på vekst
<b>Forsøk 1, ML</b>						
Negativ kontroll (35 °C)#	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	*	Negativ som forventet
Prøve 1 (0 % løsemiddel)	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Indikerer vekst
Prøve 2 (5 % løsemiddel)	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Antakelse om gelrester i DGGE-brønn
Prøve 3 (15 % løsemiddel)	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Indikerer at løsemiddelkonsentrasjonen kan ha en positiv innvirkning på vekst
Prøve 4 (30 % løsemiddel)	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Indikerer at løsemiddelkonsentrasjonen kan ha en positiv innvirkning på vekst
Prøve 5 (50 % løsemiddel)	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Indikerer at løsemiddelkonsentrasjonen kan ha en positiv innvirkning på vekst

Ved å sammenligne inokulum L004 og ML kan det se ut til at inokulumet ML har en bedre vekst med løsemiddeltilsetning enn tilsvarende kolber med L004. Resultatet er ikke definitivt da prøveserien med inokulum ML har mye høyere DNA-konsentrasjon ekstrahert fra

vannfasen enn prøveserien med inokulum L004, (vist i vedlegg J, tabell J-3-1). ML har mest sannsynlig ikke blitt detektert ved hjelp av DGGE på grunn av dette.

Både inokulum L004 og ML har god toleranse for løsemiddelblandingen da det er vekst i alle kolbene tilsatt løsemiddel.

#### 4.2. Ristekolbeforsøk 2:

Ristekolbeforsøk 2 ble utført ved å tilsette mineralmedium (MMAcYE) og olje i negativ kontroll. Mineralmedium, olje og inokulum i prøve 1 og mineralmedium, olje og økende konsentrasjoner av løsemiddel i prøve 2 til 5. Dette ble gjort for å undersøke hvilken kombinasjon som mest effektivt klarte å bryte ned de tunge komponentene i oljen.

##### 4.2.1. OD-måling av inokulum før og etter reinokulering

OD-verdier fra L004 og ML fra originalplate til reinokulert plate viser en generelt god vekst av mikroorganismer ( $>0,05$  OD) og ble godkjent for videre bruk (vedlegg L, kapittel L-1, side 111). OD-verdier ble beregnet (vedlegg D-3, formel 1, side 91).

OD-verdien for det endelige inokulumet som ble tilsatt var 1,12 OD<sub>660nm</sub> for L004 og 1,13 OD<sub>660nm</sub> ML.

##### 4.2.2. Visuell gradering av olje i vannfasen

Etter endt ristekolbeforsøk ble oljen gradert visuelt basert på hvordan oljen hadde fordelt seg i vannfasen. Graderingen er vist i graderingsskala, kapittel 3.8.1, tabell 8, side 19. Oljegraderingen fra ristekolbeforsøk 2 er vist i tabell 17.

#### **Tabell 17: Visuell gradering av oljen.**

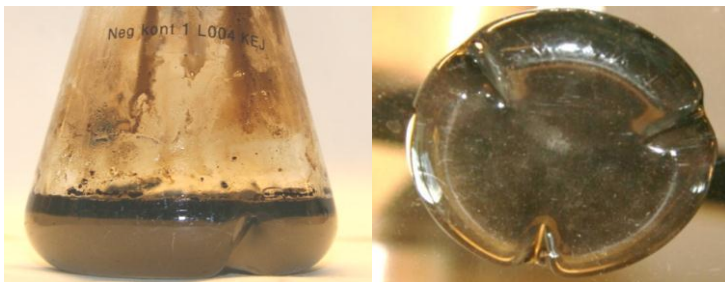
*Olje i ristekolber med inokulum L004 og ML ble gradert fra negativ til 4+, basert på graderingsskala vist i tabell 8, side 19. Prosent bak prøve-ID er tilsatt mengde løsemiddel. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.*

<b>L004</b>	<b>Gradering</b>	<b>ML</b>	<b>Gradering</b>
Negativ kontroll #	Negativ	Negativ kontroll #	Negativ
Prøve 1 (0 % løsemiddel) #	1 +	Prøve 1 (0 % løsemiddel) #	1 +
Prøve 2 (5 % løsemiddel)	3 +/4 +	Prøve 2 (5 % løsemiddel)	2 +
Prøve 3 (15 % løsemiddel)	3 +/4 +	Prøve 3 (15 % løsemiddel)	2 +
Prøve 4 (30 % løsemiddel)	2 +	Prøve 4 (30 % løsemiddel)	2 +
Prøve 5 (50 % løsemiddel)	3 +/4 +	Prøve 5 (50 % løsemiddel)	1 +

Ristekolbene med inokulum L004 viser størst tendens til fysisk endring av oljefasen visuelt.

#### 4.2.3. Bilder av ristekolbene og mikroskopi av vannfase

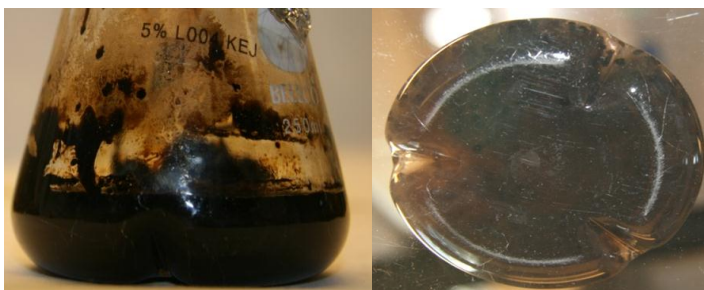
Bilder ble tatt etter endt ristekolbeforsøk for å dokumentere visuelle endringer av oljefasen. Vannfasen ble mikroskopert ved endt ristekolbeforsøk for å prøve å gi en indikasjon på ulikhet i vekst av mikroorganismene ved de forskjellige løsemiddelkonsentrasjonene. Prøveserien med inokulum L004 viste mest tendens til endring i oljefasen og er vist i figur 19 til 24. Bildene av ristekolbene med inokulum ML er vist i vedlegg L, kapittel L-2-1, side 113.



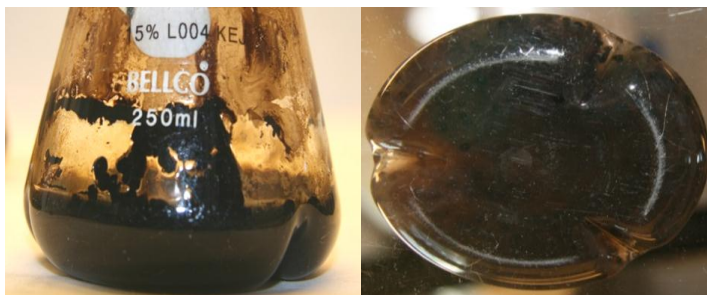
**Figur 19:** *Negativ kontroll L004, dag 7 - Kolben inneholder mineralmedium MMAcYE og olje, og viser at oljen ligger som et flak på vannfasen*



**Figur 20:** *Prøve 1 L004, dag 7 - Kolben inneholder mineralmedium MMAcYE, inokulum og olje, og viser at oljen har samlet seg som klumper i vannfasen.*



**Figur 21:** *Prøve 2 L004, dag 7 - Kolben inneholder mineralmedium MMAcYE, inokulum, 5 % løsemiddel og olje, og viser at oljen har samlet seg som små klumper i vannfasen.*



**Figur 22: Prøve 3 L004, 50 % løsemiddel, dag 7 -** Kolben inneholder mineralmedium MMacYE, inokulum, 15 % løsemiddel og olje, og viser at oljen har samlet seg til små klumper i vannfasen



**Figur 23: Prøve 3 L004, 50 % løsemiddel, dag 7 -** Kolben inneholder mineralmedium MMacYE, inokulum, 30 % løsemiddel og olje, og viser at oljen har samlet seg til små klumper og oljefraksjoner i vannfasen.

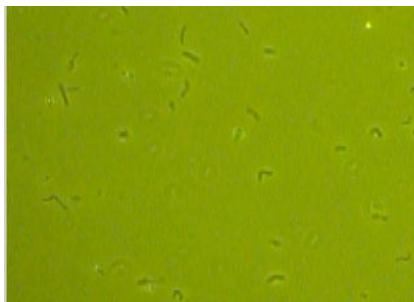


**Figur 24: Prøve 5 L004, 50 % løsemiddel, dag 7 -** Kolben inneholder mineralmedium MMacYE, inokulum, 50 % løsemiddel og olje. Bildet viser at oljen er emulgert i vannfasen .

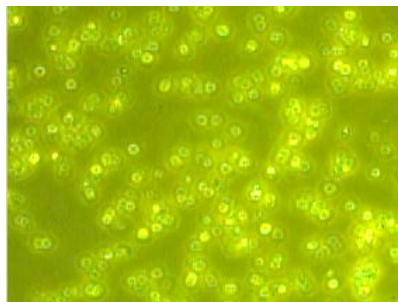
Kolbene viser en tendens til endring av oljefasen i alle prøvekolbene (figur 19-24). Negativ kontroll, med prøveserien tilsatt inokulum L004 er negativ (figur 19), dette kan sees ved at oljefasen ligger som et flakt over vannfasen. Dette viser også negativ kontroll ML vist i vedlegg L, kapittel L-2, figur L-1, side 113. Det kan se ut til at det er størst tendens til emulgering i ristekolben med tilsats av 50 % løsemiddel.



Det var vanskelig å differensiere om det var olje vasket ut fra oljefasen eller mikroorganismer som vistes i vannfasen ved å se på mikroskopibildene i dette ristekolbeforsøket (figur 25 og 26). Det var derfor ikke mulig å sammenligne effekten på biokonverteringen av økende løsemiddelkonsentrasjon og inokulum, mot inokulumets påvirkning alene basert på mikroskopibildene.



**Figur 25: Mikroskopi, Negativ kontroll L004, dag 7 -**  
Kolben inneholder mineralmedium MMAcYE og olje. Mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer.



**Figur 26: Mikroskopi, Negativ kontroll ML, dag 7 -**  
Kolben inneholder mineralmedium MMAcYE og olje. Mikroskopibildet viser ingen mikroorganismer i vannfasen. De gule sirklene som lyser opp antas å være små oljedråper.

I mikroskopibildet fra negativ kontroll (figur 25) ser det ut til at det er oppvekst av mikroorganismer i prøveserien med inokulum L004 (Merk at det er ikke tilsatt inokulum eller løsemiddel i negativ kontroll). Dette kan skyldes mikroorganismer fra selve oljeprøven eller olje vasket over i vannfasen. Det kan være mikroorganismer som er naturlig tilstede i oljen ettersom oljen ikke er steril og mineralmediet vil stimulere til vekst. Fordi oljen sannsynligvis ikke har vært tappet og lagret under sterile betingelser, er det sannsynlig at kontaminering med mikroorganismer har funnet sted. Sammenligning av diversitetsmønster ved DGGE i negativ kontroll mot prøvene kan gi en indikasjon på eventuelle forskjeller (kap. 4.2.6, side 44). I ristekolbeforsøk 3 vil kontroller på om det faktisk er mikroorganismer fra oljen, bli prøvd bekreftet eller avkreftet med nye mikroskopibilder og DNA-analyser. Det kan ikke utelukkes at løsemiddelet også kan bidra til kontaminering i prøvene tilsatt løsemiddel, men det er lite trolig at mikroorganismene vil overleve i fravær av vann i originalflaskene med løsemiddel. Det kan heller ikke utelukkes at det kan ha skjedd en kontaminering ved blanding av løsemiddel eller i ristekolbeforsøkene, men det mistenkes at det er mikroorganismer som stammer fra oljen. Negativ kontroll til prøveserien med inokulum ML (figur 26) er også vanskelig å differensiere med tanke på oljedråper og mikroorganismer (Merk også her, at det er ikke tilsatt inokulum i negativ kontroll). De gule sirklene som vises på bildene antas å være

oljedråper som lyser opp. Resterende mikroskopibilder for ML er vist i vedlegg L, kapittel L-3, side 115 og for L004 i kapittel L-2, side 113.

#### **4.2.4. Måling av DNA-konsentrasjon fra DNA-isolering**

DNA isolert fra vannfasen til ristekolbene viste generelt lave DNA-konsentrasjoner (vedlegg L, kapittel L-4, side 116). A260/A280 ratioen viste varierende resultater både under og over 1,8. A260/A230 ratio viste også varierende resultater med ratio under 1,8-2,2. Dette vil si at DNA fra ristekolbeforsøk 2 var urent.

#### **4.2.5. Analyse av 16S rRNA PCR-produkt for produktsjekk av bakterie og archaea på agarosegel**

Agarosegel med PCR-produkt syntetisert med primerene 16S rRNA primere 341 f Bac og 907 r Bac ble kjørt for å sjekke om DNA-isoleringen ble vellykket. Det ble funnet produkt i prøvene som var tilsatt inokulum. Ettersom disse gelene kun er et trinn for å sjekke produkt vil de ikke bli tatt med videre i resultatvurdering.

PCR med 16S rRNA primere Arch 20 f mod/Arch 958 r mod for archaea ble kjørt på en agarosegel. Det ble ikke funnet Archaea i ristekolbeforsøk 2

#### 4.2.6. Analyse av 16s rRNA PCR-produkt på agarose- og DGGE gel

PCR-produkt til DGGE syntetisert med primerene 341 f Bac clamp og 907 r Bac ble kjørt på agarosegel for å sjekke produkt og båndintensiteten til L004 og ML, som beskrevet i kapittel 3.8.9, side 25. PCR-produkt ble så kjørt på DGGE for å få en indikasjon på biodiversiteten til mikroorganismene i DNA-prøvene:

##### a) *Prøveserie med inokulum L004*

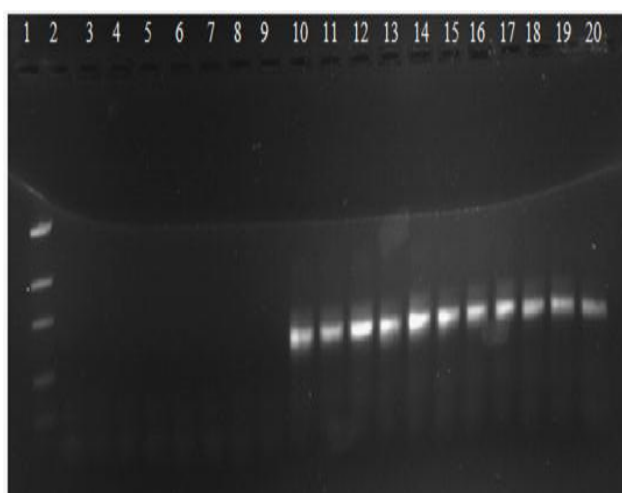
PCR-produktene fra DNA i vannfasen til prøveserien tilsatt inokulum L004 er vist i figur 27 med tilhørende prøve-ID i tabell 18.

For å få en indikasjon på biodiversiteten til mikroorganismene ble PCR-produktene så kjørt på DGGE (figur 28). Noen prøver som var negativ på agarosegel ble også kjørt på DGGE for å bekrefte resultatet (negativ kontroll dag 1 og dag 3 og reagenskontroll)

##### **Tabell 18: Brønnoppsett agarosegel 1.**

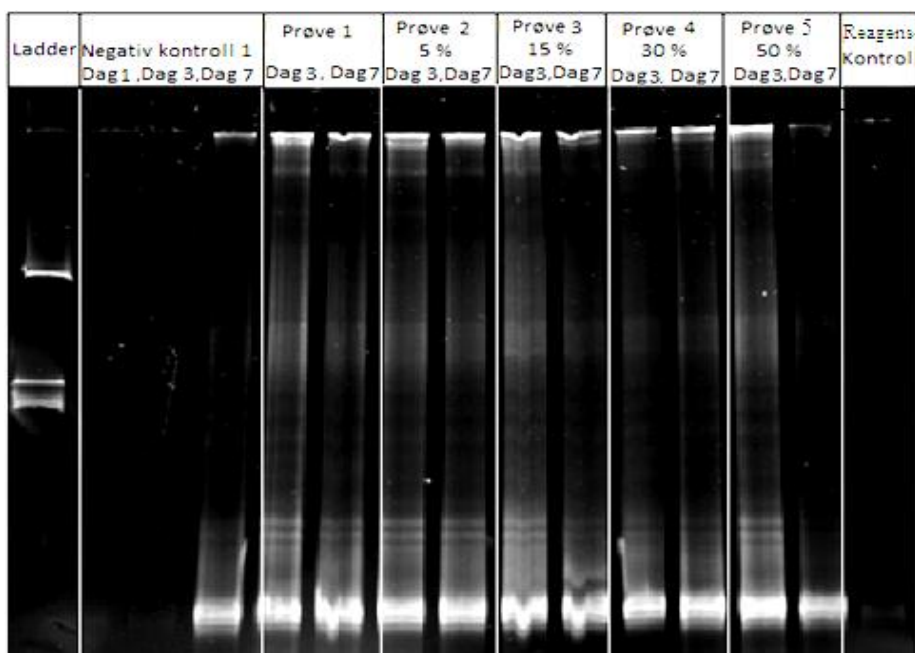
*Prøvene er sortert på inokulum L004 og kronologisk for prøvetakningsdag. Prosent vist bak prøvenavn er prosent løsemiddel tilsatt. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.*

Brønn	Prøve	Dag	Brønn	Prøve	Dag
1	Ladder		11	L004 Prøve 2 (5 %)	3
2	L004 Negativ kontroll #	1	12	L004 Prøve 3 (15 %)	3
3	L004 Prøve 1 (0 %)	1	13	L004 Prøve 4 (30 %)	3
4	L004 Prøve 2 (5 %)	1	14	L004 Prøve 5 (50 %)	3
5	L004 Prøve 3 (15 %)	1	15	L004 Negativ kontroll #	7
6	L004 Prøve 4 (30 %)	1	16	L004 Prøve 1 (0 %)	7
7	L004 Prøve 5 (50 %)	1	17	L004 Prøve 2 (5 %)	7
8	Reagens kontroll #		18	L004 Prøve 3 (15 %)	7
9	L004 Negativ kontroll #	3	19	L004 Prøve 4 (30 %)	7
10	L004 Prøve 1 (0 %)	3	20	L004 Prøve 5 (50 %)	7



**Figur 27: Agarosegel 1, forsøk 2.** PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. DNA ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøve-ID er oppført i tabell 18.

Agarosegelen vist i figur 27 viser at det ble funnet bånd i alle prøvene bortsett fra brønn 2 til 7, som er DNA prøver tatt fra dag 1. Det kan tenkes at det er for få mikroorganismer tilstede til å detekteres ved hjelp av de metodene som er brukt på dette stadiet. Forventet baseparlengde med primerne 341 f Bac clamp og 907 r Bac er 606 basepar. De resterende prøvene har baseparlengde rundt 606 basepar, som forventet (vist i tabell 9). Negative kontroller ble negative som forventet, bortsett fra negativ kontroll L004, dag 7. Som tidligere nevnt kan dette komme av at selve oljeprøven ikke er steril (Kap 4.2.3, side 41), noe som kan gjøre at mikroorganismer fra selve oljeprøven kan påvirke resultatet.



**Figur28: DGGE gel 1, L004, forsøk 2.** PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. DNA-ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøve-ID er merket over bildet.

DGGE-gelen vist i figur 28 viser at negativ kontroll 1, dag 7 som viste bånd på agarosegelen fikk også bånd på DGGE gelen. Det kan ikke utelukkes at det kan ha skjedd en kontaminering, men det mistenkes at det er mikroorganismer som har kommet fra oljen. Tidligere har det blitt nevnt at oljen ikke er steril eller at det kan ha vært en kontaminering (kap 4.2.3, side 41), og derfor kan ha bidratt til dette. Det kan ikke utelukkes at løsemiddelet også kan bidra til kontaminering, men det er lite trolig at mikroorganismene vil overleve i fravær av vann i originalflaskene med løsemiddel. Ved å sammenligne diversitetsmønster i negativ kontroll og prøver ser man en indikasjon på biodiversitetsforskjell. Dette kan bety at det er andre mikroorganismer enn de tilsatt fra inokulum som har kommet opp.

DGGE-gelen viser antydning til høy biodiversitet i resterende prøver bortsett fra prøve 5, dag 7 noe som kan skyldes svake konsentrasjoner eller liten biodiversitet ved at båndene har samlet seg nederst.

**a) Prøveserie inokulum ML**

PCR-produktene fra DNA i vannfasen til prøveserien tilsatt inokulum L004 er vist i figur 29 med tilhørende prøve-ID i tabell 19.

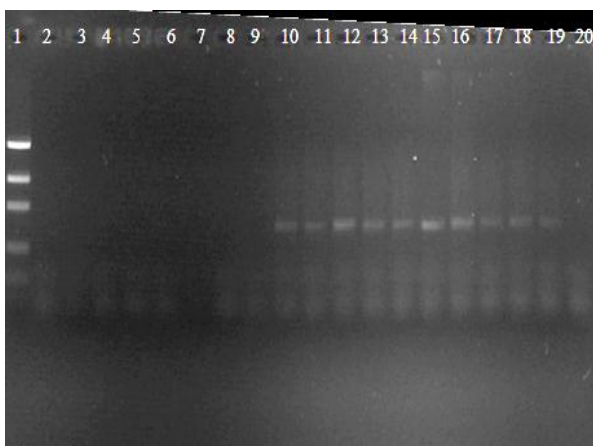
For å få en indikasjon på biodiversiteten til mikroorganismene ble PCR-produktene så kjørt på DGGE (figur 30). Negativ kontroll, dag 3, som var negativ på agarosegel ble også kjørt på DGGE for å bekrefte resultatet.

**Tabell 19: Brønnoppsett agarosegel 2.**

*Prøvene er sortert på inokulum ML og kronologisk for prøvetaknings dag.*

*Prosent vist bak prøve-ID er tilsatt løsemiddel i prøvene. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.*

Brønn	Prøve	Dag	Brønn	Prøve	Dag
1	Ladder		11	ML Prøve 2 (5 %)	3
2	ML Negativ kontroll #	1	12	ML Prøve 3 (15 %)	3
3	ML Prøve 1 (0 %)	1	13	ML Prøve 4 (30 %)	3
4	ML Prøve 2 (5 %)	1	14	ML Prøve 5 (50 %)	3
5	ML Prøve 3 (15 %)	1	15	ML Negativ kontroll #	7
6	ML Prøve 4 (30 %)	1	16	ML Prøve 1 (0 %)	7
7	ML Prøve 5 (50 %)	1	17	ML Prøve 2 (5 %)	7
8	Reagens kontroll #		18	ML Prøve 3 (15 %)	7
9	ML Negativ kontroll #	3	19	ML Prøve 4 (30 %)	7
10	ML Prøve 1 (0 %)	3	20	ML Prøve 5 (50 %)	7



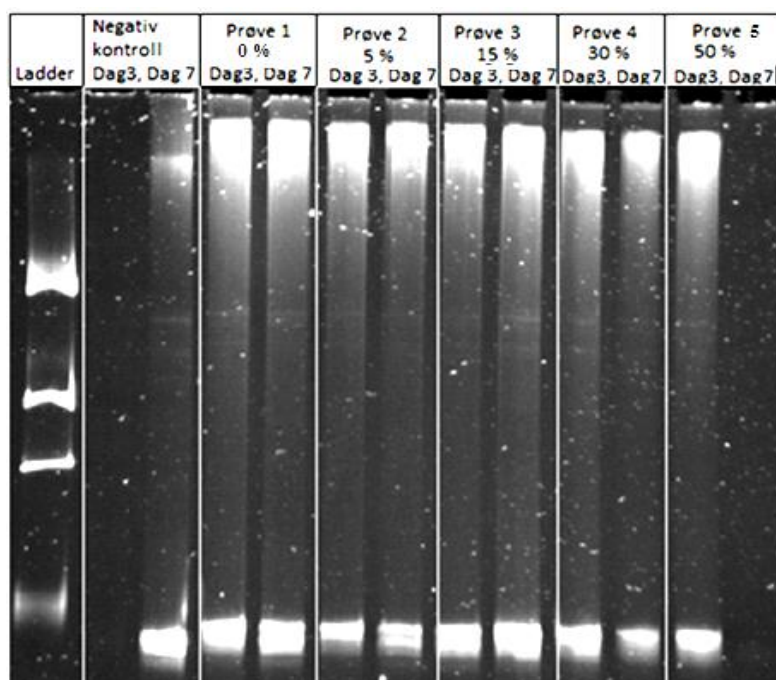
**Figur29: Agarosegel 2, forsøk 2.**

*PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. DNA ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøve-ID er oppført i tabell 19.*

Agarosegelen vist i figur 29 viser at alle prøvene hadde baseparlengde mellom 400 og 800 basepar og ligger på samme plass.

Det ble funnet bånd i alle prøvene bortsett fra brønn 2 til 7, som tilsvarer DNA-prøvene tatt fra dag 1, det kan tenkes at mikroorganismene trenger en lengre log-fase til å detekteres på dette stadiet eller at DNA-isoleringsmetoden ikke er optimal ved så lav vekst. Negative kontroller ble negative som forventet, bortsett fra negativ kontroll L004, dag 7. Som tidligere nevnt kan dette komme av at selve oljeprøven ikke er steril (kap 4.2.3, side 41).

I ristekolbeforsøk 3 vil det blir kjørt en ytterligere kontroll for å gi en indikasjon på om det er mikroorganismer fra oljen som bidrar til DNA produkt.



**Figur 30: DGGE gel 1, ML, forsøk 2.**

PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac.

DNA-ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør.

Prøve ID er merket over bildet.

DGGE-gelen vist i figur 30 viser at negativ kontroll 1, dag 7 som viste bånd på agarosegelen fikk også bånd på DGGE gelen.

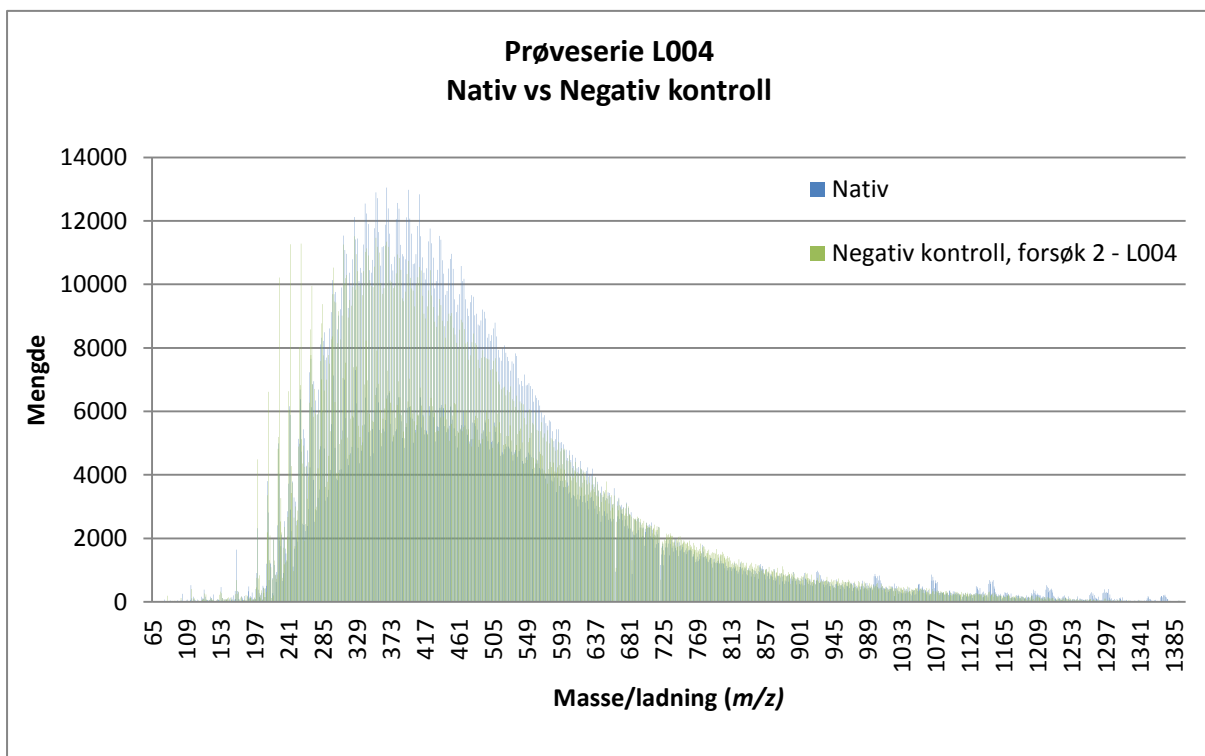
Båndene som vises er svake, noe som gjør det vanskelig å se forskjell på biodiversiteten, men det ser ut til at den negative kontrollen har litt andre bånd enn prøvene. Dette kan indikere at andre mikroorganismer enn de som er tilsatt fra inokulumet har kommet opp.

Det kan se ut til at biodiversitetsmønsteret i prøvene ligner på hverandre. Prøve 5, dag 7 har ikke kommet opp på gelen, noe som kan skyldes svake DNA-konsentrasjoner eller for lite produkt.

#### 4.2.7. ESI-MS, ristekolbeforsøk 2

Et spekter fra nativ olje sammenlignet med negativ kontroll er vist i figur 31. Denne sammenligningen viser at negativ kontroll har mindre mengde av de tunge komponentene fått mer av de små komponentene i forhold til negativ kontroll. Det vil si at høy temperatur og risting alene kan føre til at vannløselige fraksjoner elueres fra oljen som nevnt i kapittel 3.3, side 11.

Spektra fra ESI-MS ble behandlet med et multivariat data analysesystem (Simca-P+ 12.1) for å undersøke mønstergjenkjenning med likhet og forskjeller mellom spektra.

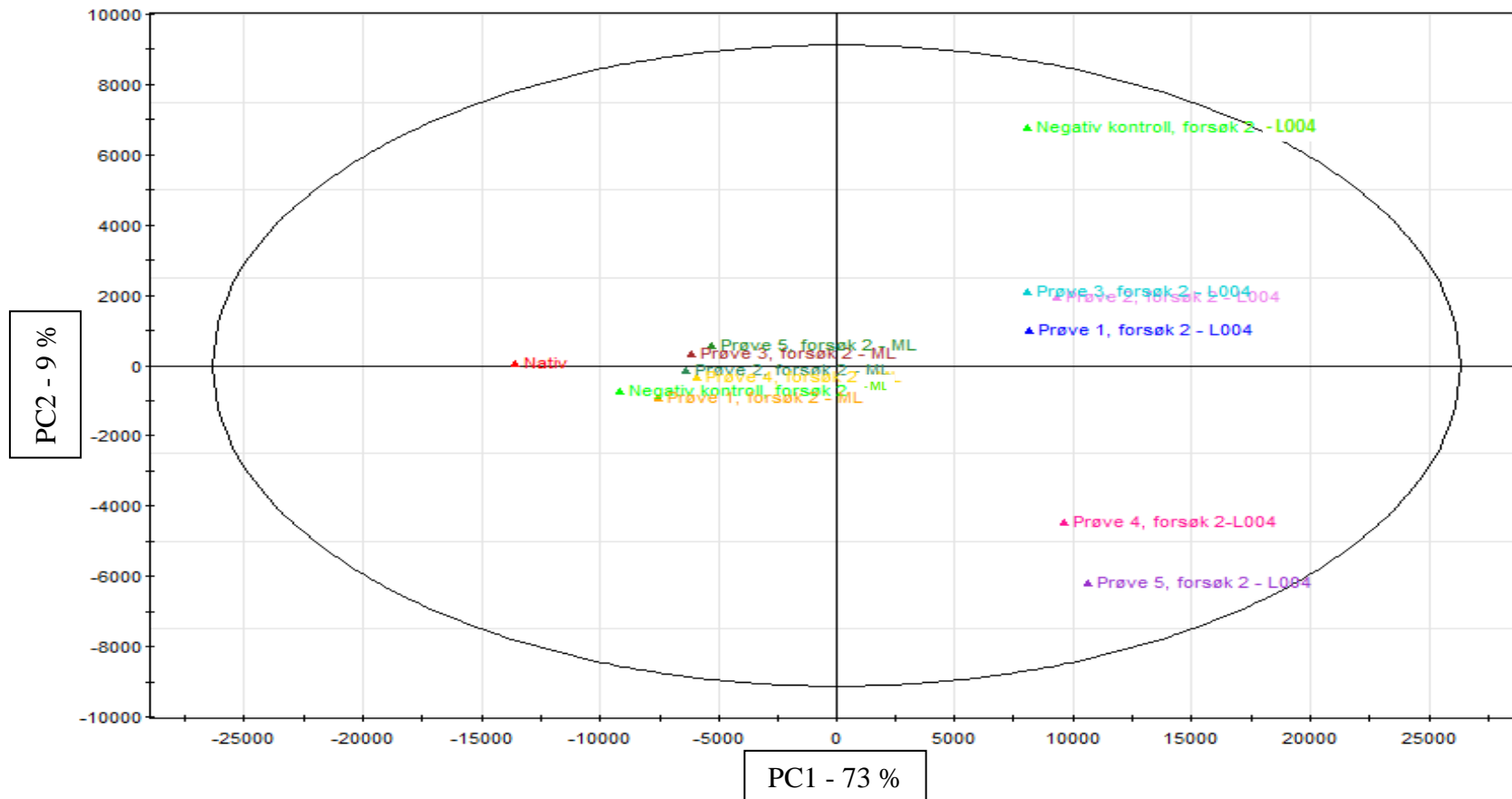


**Figur 31: Nativ olje vs. negativ kontroll, ristekolbeforsøk 2 – L004**

Figuren viser en sammenligning av spektra fra nativ olje og negativ kontroll for å undersøke om negativ kontroll hadde høyere andel av de molekylære komponentene i forhold til prøven. X-aksen viser masse/ladning ( $m/z$ ) og Y-aksen viser mengde av komponenter ved de ulike  $m/z$  verdiene.

### Likhet og forskjeller mellom spektra i ristekolbeforsøk 2

Likhet og forskjeller mellom spektra ble evaluert ved PCA, ved hjelp av Simca P+ 12.1 og er vist i figur 32. Dette ble gjort for å undersøke om prøvene tilsatt kun inokulum og olje (Prøve 1) og inokulum, olje og ulike mengder løsemiddel (prøve 2-5) var like eller ulike. I tillegg ble det undersøkt om tilsatt løsemiddel hadde en positiv eller negativ innvirkning på oljeprøvene og hvor mye prøvene skilte seg fra negativ kontroll som kun inneholdt olje.



**Figur 32: Multivariat ved hjelp av SIMCA multivariat program for å vise sammenheng mellom nativ olje og prøvene i forsøk 2**

Figuren viser et PCA-plott av oljeprøvene i forsøk 2 med SIMCA multivariat-analyse.

X-aksen viser "principal component 1" som forklarer 73 % variasjon i prøvene. Y-aksen viser "principal component 2" som forklarer 9 % variasjon i prøvene. Nativ olje er ubehandlet olje.



PCA i figur 32 viser at prøveseriene med forskjellig inokulum gir forskjellig innvirkning på oljeprøvene. Det er ikke så stor forskjell i prøveseriene innad i gruppen til inokulum ML og L004 siden Y-aksen bare viser variasjon på 9 %, men det kan sies med sikkerhet at det er forskjell mellom prøveseriene; L004 og ML, som har undergått ristekolbeforsøk med forskjellig inokulum/temperatur (L004/60 °C og ML/35 °C) siden X-aksen viser 70 % variasjon.

PCA viser at det er to “clusters” som danner seg og disse klynger seg sammen i sin forsøksserie og ved tilhørende inokulaserie/temperatur. Negativ kontroll ved begge prøveseriene er ikke tilsatt inokulum.

Variasjonen i PC2 viser at prøveserien med inokulum L004 har et annet forløp enn prøveserien med inokulum ML. Det kan antas at løsemiddelet har en bedre effekt sammen med inokulum L004 enn prøveserien med inokulum ML og løsemiddel.

Prøvene er ganske lik negativ kontrollene som ikke er tilsatt inokulum. Det kan tenkes at den høye temperaturen i prøveserien med inokulum L004 har innvirkning på den fraksjonelle endringen, men den negative kontrollen til prøveserien tilsatt inokulum L004 viser en større endring fra prøvene. Selv om det er liten variasjon (9 %) kan det se ut til at inokulum L004 har hatt mer påvirkning på den fraksjonelle endring i oljen enn inokulum ML. Prøve 4 og 5 viser også en liten tendens til å variere fra resten av prøvene, noe som kan indikere at 30 % og 50 % løsemiddel har hatt en større innvirkning på oljefraksjonene enn de andre prøvene med mindre mengde løsemiddel (prøve 2 og 3) og prøve 1 uten løsemiddel.

Prøveserien som inneholder inokulum L004 som er kjørt ved 60 °C er den prøveserien som viser størst tendens til endring fra den native oljen som ikke har undergått ristekolbeforsøk.

#### 4.2.8. Samletabell, ristekolbeforsøk 2

En samletabell ble laget for alle resultatene fra ristekolbeforsøk 2 og er vist som tabell 20.

Tabellen er basert på de ulike metodene og deres resultat. Positiv mikroskopi betyr funn av mikroorganismer i vannfasen. Positiv agarose- og DGGE gel betyr at det ble funnet bånd som tyder på økt biodiversitet dag 3 og dag 7. Resultatene fra ESI-MS er vist ved grad av endring i oljekomponentene basert på sammenligning mellom negativ kontroll og prøver ved hjelp av PCA analyse.

**Tabell 20: Samletabell over resultater fra ristekolbeforsøk 2.**

Tabellen er basert på de ulike metodene og deres resultat. Positiv agarose- og DGGE gel betyr at det ble funnet bånd som tyder på økt biodiversitet dag 3 og dag 7 i forhold til. ved oppstart/dag 1. Prøver merket med stjerne (\*) betyr at prøvene ikke er kjørt på DGGE grunnet negativt resultat på agarosegel, pga. forventning om at disse også ville gitt negative resultat på DGGE- gel. Resultatene fra ESI-MS er vist ved grad av endring i oljekomponentene basert på sammenligning mellom negativ kontroll og prøver ved hjelp av PCA analyse. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum. Prøver merket i grønt viser best indikasjon på biokonvertering.

<b>Ristekolbeforsøk 2 L004</b>	<b>Visuell gradering</b>	<b>Agarosegel</b>			<b>DGGE</b>			<b>ESI-MS</b>	<b>Kommentar</b>
<b>Prøve-ID</b>		<b>Dag 1</b>	<b>Dag 3</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 1</b>	<b>Dag 3</b>	<b>Dag 7</b>		
Negativ kontroll #	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ	Positiv		Mistanke om at oljen bidrar til DNA produkt
Prøve 1 (0 % løsemiddel)	1 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Svak endring	Tendens til biokonvertering
Prøve 2 (5 % løsemiddel)	3 +/4 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Endring	Tendens til biokonvertering
Prøve 3 (15 % løsemiddel)	3 +/4 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Endring	Tendens til biokonvertering
Prøve 4 (30 % løsemiddel)	2 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Større Endring	Tendens til biokonvertering
Prøve 5 (50 % løsemiddel)	3 +/4 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Negativ	Større endring	Tendens til biokonvertering

Tabellen fortsetter

Resultater -  
Ristekolbeforsøk 2

**Tabell fortsetter**

<b>Ristekolbeforsøk 2 -ML</b>	<b>Visuell gradering</b>	<b>Agarosegel</b>			<b>DGGE</b>			<b>ESI-MS</b>	<b>Kommentar</b>
		<b>Dag 1</b>	<b>Dag 3</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 1</b>	<b>Dag 2</b>	<b>Dag 3</b>		
Negativ kontroll #	Negativ	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ*	Negativ	Positiv		Mistanke om at oljen bidrar til DNA produkt
Prøve 1 (0 % løsemiddel)	1 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Svak endring	Viser liten tendens til biokonvertering.
Prøve 2 (5 % løsemiddel)	2 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Svak endring	Viser liten tendens til biokonvertering.
Prøve 3 (15 % løsemiddel)	2 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Svak endring	Viser liten tendens til biokonvertering.
Prøve 4 (30 % løsemiddel)	2 +	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Svak endring	Viser liten tendens til biokonvertering.
Prøve 5 (50 % løsemiddel)	1 +	Negativ	Positiv	Negativ	Negativ*	Positiv	Negativ	Svak endring	Viser liten tendens til biokonvertering.

Samletabellen fra ristekolbeforsøk 2 (figur 20) viser at L004 har størst tendens til biokonvertering sammen med løsemiddel.

Ristekolbeforsøk 2 viser at L004 og ML har noe forskjellig virkningsmekanisme. L004 viser tendens til biokonvertering og at løsemiddelet kan bidra til effekt. ML kan ha en liten biokonverterende effekt, men løsemiddelet bidrar ikke til økt effekt.

### 4.3. Ristekolbeforsøk 3

#### 4.3.1. OD-verdier av inokulum etter reinokulering

Mikroorganismene i dette ristekolbeforsøket ble dyrket opp fra glyserolnedfryst inokula fra ristekolbeforsøk 2, som beskrevet i kapittel 4.4.3, a) og b).

OD-verdien ved 660 nm til L004 ble målt til 0,995 OD<sub>660nm</sub> og ML ble målt til 1,01 OD<sub>660nm</sub> og ble funnet godkjent for videre bruk (beregninger er vist i vedlegg M, side 118).

#### 4.3.2. Visuell gradering av olje i vannfasen

Etter endt ristekolbeforsøk ble oljen gradert visuelt basert på hvordan oljen hadde fordelt seg i vannfasen. Graderingen er vist i graderingsskala, kapittel 3.8.1, tabell 8, side 19. Oljegraderingen fra ristekolbeforsøk 3 er vist i tabell 21.

**Tabell 21: Gradering av olje ristekolbeforsøk 3**

*Olje i ristekolber med inokulum L004 og ML ble gradert fra negativ til 4+, basert på graderingsskala vist i tabell 4. Negativ kontroll tre er merket med strek (-) siden denne kontrollen ikke inneholder olje. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.*

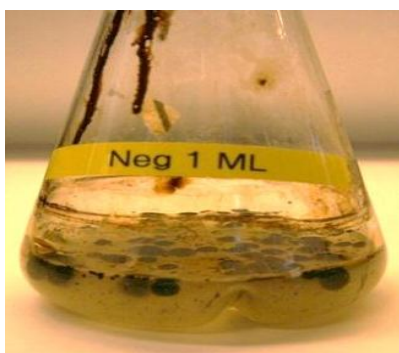
<b>L004</b>	<b>Gradering</b>	<b>ML</b>	<b>Gradering</b>
Negativ kontroll 1 #	2+/3+	Negativ kontroll 1 #	2+
Negativ kontroll 2 #	1+/2+	Negativ kontroll 2 #	1+/2+
Negativ kontroll 3 #	-	Negativ kontroll 3 #	-
Prøve 1 (5 % u/inokulum) #	3+/4+	Prøve 1 (5 % u/inokulum) #	3+
Prøve 2 (50 % u/inokulum) #	1+/2+	Prøve 2 (50 % u/inokulum) #	2+/3+
Prøve 3 (5 % m/inokulum)	1+/2+	Prøve 3 (5 % m/inokulum)	1+
Prøve 4 (50 % m/inokulum)	1+/2+	Prøve 4 (50 % m/inokulum)	1+

Visuell gradering tyder på fysisk endring i oljefasen til negativ kontroll 1 og 2 for begge prøveseriene med inokulum L004 og ML. Dette kan indikere at det har skjedd en fraksjonell endring på grunn av høy temperatur og risting alene som beskrevet i kapittel 3.3, side 11. Prøve 1 og 2 (uten inokulum) viser også en tendens til fysisk endring i oljefasen og dette kan indikere at løsemiddelet til en viss grad løser opp oljen i kombinasjon med høy temperatur og risting.

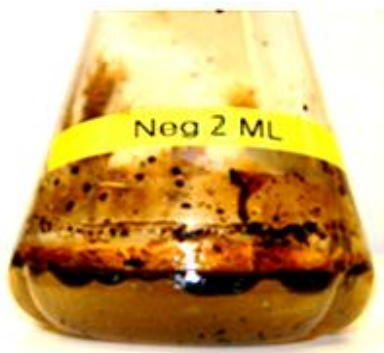
Prøve 3 og 4 tilsatt inokulum viser også en indikasjon på endring i oljefasen, men viser ikke så stor endring som forventet i forhold prøve 1 og 2, som ikke er tilsatt inokulum. Dette kan skyldes at inokula ble dyrket opp fra glyserolampulle med inokula fra ristekolbeforsøk 2 og at noen av bakteriene ikke har overlevd nedfrysning på glyserol.

#### 4.3.3. Bilder av ristekolbene og mikroskopi av vannfase

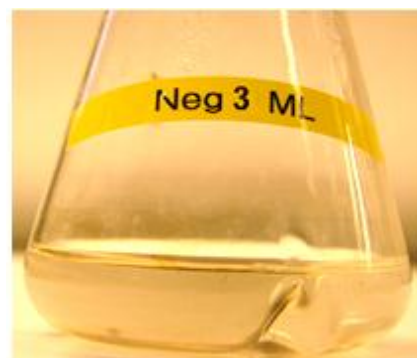
Bilder ble tatt etter endt ristekolbeforsøk for å dokumentere eventuelle visuelle endringer i oljefasen. Vannfasen i ristekolbene ble mikroskopert ved endt ristekolbeforsøk for å prøve å gi en indikasjon på ulikhet i vekst av mikroorganismene ved de forskjellige løsemiddelkonsentrasjonene. Bilder tatt av ML viste mest tendens til endring i oljefasen og er vist i figur 33 til 39. Bildene av ristekolbene med L004 viste noe mindre endring og er vist i vedlegg M, kapittel M-2, side 119.



**Figur 33: Negativ kontroll 1 ML**  
Kolben inneholder mineralmedium og olje, og viser at oljen har klumpet seg i vannfasen



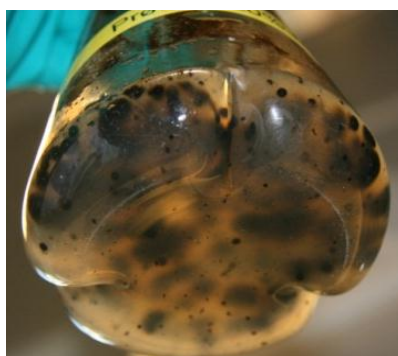
**Figur 34: Negativ kontroll 2 ML**  
Kolben inneholder mineralmedium og olje, og viser at oljen har klumpet seg i vannfasen



**Figur 35: Negativ kontroll 3 ML**  
Inneholder kun mineralmedium og viser blank vannfase



**Figur 36: Prøve 1, ML - dag 7**  
Kolben inneholder 5 % løsemiddel og olje og viser at oljen har klumpet seg i vannfasen



**Figur 37: Prøve 2, ML - dag 7**  
Kolben inneholder 50 % løsemiddel og olje, og viser at oljen har klumpet seg i vannfasen



**Figur 38: Prøve 3, ML - dag 7**  
Kolben inneholder inokulum, 5 %  
løsemiddel og olje, og viser at oljen  
har klumpet seg i vannfasen



**Figur 39: Prøve 4, ML - dag 7**  
Kolben inneholder inokulum, 50 %  
løsemiddel og olje, og viser at oljen  
har klumpet seg i vannfasen

Bildene viser en tendens til endring i oljefasen i alle kolbene (figur 33-39). Negativ kontroll 1 og 2 for prøveseriene med inokulum L004 og ML viser også en tendens til endring i oljefasen (figur 33 og 34 for L004, vedlegg M-2 figur M-1 og M-2, side 119 for ML). (Merk at negativ kontroll ikke er tilsatt inokulum). Dette kan skyldes at høy temperatur og risting alene kan føre til at vannløselige fraksjoner elueres fra oljen som beskrevet i kapittel 3.3 side 11. Ved visuell vurdering kan det se ut til at det er størst tendens til endring i oljefasen til prøvene med tilsatt av 5 % løsemiddel i prøveseriene L004 (figur 36).

Det var vanskelig å se forskjell på fragmenter fra oljefasen og mikroorganismene ved å se på mikroskopibildene fra vannfasen i dette ristekolbeforsøket (figur 40-43).

I mikroskopibildet fra negativ kontroll 1 og 2 og i prøveseriene for både inokulum ML (figur 41 og 42) og L004 (figur 43 og 44), ser det ut til at det er oppvekst av mikroorganismer. Dette kan skyldes mikroorganismer fra selve oljeprøven eller det kan være små oljefragmenter som har blitt vasket ut i vannfasen, som tidligere nevnt.



**Figur 40: Negativ kontroll 1, ML, forsøk 3-**

Kolben inneholder kun mineralmedium MMacYE og olje. Mikroskopibildet viser oljefragmenter eller mikroorganismer i vannfasen



**Figur 41: Negativ kontroll 2, ML, forsøk 3-**

Kolben inneholder kun mineralmedium MMacYE og olje. Mikroskopibildet viser oljefragmenter eller mikroorganismer i vannfasen



**Figur 42: Negativ kontroll 1, L004, forsøk 3-**

Kolben inneholder kun mineralmedium MMacYE og olje. Mikroskopibildet viser oljefragmenter eller mikroorganismer i vannfasen



**Figur 43: Negativ kontroll 2, L004, forsøk 3-**

Kolben inneholder kun mineralmedium MMacYE. Mikroskopibildet viser oljefragmenter eller mikroorganismer i vannfasen

Negativ kontroll 3 for prøveserien med inokulum ML og L004 som ikke er tilsatt hverken olje eller inokulum, viser ingen tegn til oppvekst av mikroorganismer på mikroskopibildene og dette er med på å utelukke kontaminering (Figur 44 og 45). Resterende mikroskopibilder fra L004 er vist i vedlegg M, kapittel M-2, side 119 og fra ML i vedlegg M-3, side 122.



**Figur 44: Negativ kontroll 3, ML, forsøk 3-**

*Kolben inneholder kun mineralmedium MMAcYE. Mikroskopibildet viser ingen mikroorganismer i vannfasen*



**Figur 45: Negativ kontroll 3, L004, forsøk 3-**

*Kolben inneholder kun mineralmedium MMAcYE. Mikroskopibildet viser ingen mikroorganismer i vannfasen*



#### **4.3.4. Måling av DNA-konsentrasjon fra DNA-isolering**

DNA-konsentrasjonene fra ristekolbeforsøk 3 var generelt lave (vedlegg M, kapittel M-4, side 124). A260/A280 ratioen viste varierende resultater både under og over 1,8. A260/A230 ratio viste også varierende resultater med ratio under 1,8-2,2. Dette indikerer at DNA er urent.

#### **4.3.5. Analyse av 16S rRNA PCR-produkt for produktsjekk av bakterie og archaea på agarosegel**

Agarosegel med PCR-produkt syntetisert med primerene 16S rRNA primere 341 f Bac og 907 r Bac ble kjørt for å sjekke om DNA-isoleringen var vellykket. Det ble funnet produkt i prøvene som var tilsatt inokulum. Ettersom disse gelene kun er et trinn for å sjekke produkt vil de ikke bli tatt med i resultatvurdering.

PCR med 16S rRNA primere Arch 20 f mod/Arch 958 r mod for archaea ble kjørt på en agarosegel. Det ble ikke funnet Archaea i ristekolbeforsøk 3.

**4.3.6. Analyse av 16s rRNA PCR-produkt på agarose- og DGGE gel**

PCR-produkt til DGGE (syntetisert med primerene 341 f Bac clamp og 907 r Bac) ble analysert på agarosegel for å sjekke produkt og båndintensiteten til L004 og ML som beskrevet i kapittel 3.8.9, side 25.

PCR-produkt ble så kjørt på DGGE for å få en indikasjon på biodiversiteten til mikroorganismene i DNA-prøvene:

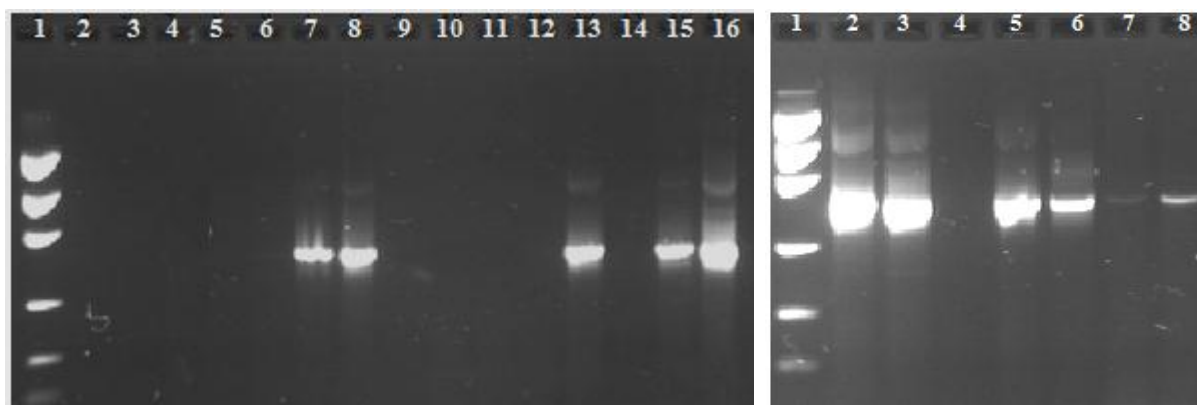
**a) Prøveserie med inokulum L004**

PCR resultatene fra DNA-produktene til ristekolbene tilsatt inokulum L004 er vist i figur 46 med tilhørende prøve-ID vist i tabell 22. For å få en indikasjon på biodiversiteten i DNA prøvene ble PCR-produktene så kjørt på DGGE (figur 47). De prøvene som ikke hadde bånd på agarosegelen ble ikke kjørt, men negativ kontroll 3, dag 7 og prøve 2 dag 3 ble tatt med.

**Tabell 22: Brønnoppsett agarosegel 1 og 2, ristekolbeforsøk 3**

Prøvene er sortert på inokulum L004 og ML og kronologisk for prøvetakningsdag. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum. Merk at negativ kontroll 3 ikke er tilsatt olje.

Brønn	Prøve	Dag	Brønn	Prøve	Dag
<b>Gel 1</b>			<b>Gel 2</b>		
1	Ladder		1	Ladder	
2	L004 Negativ kontroll 1 #	1	2	L004 Negativ kontroll 1 #	7
3	L004 Negativ kontroll 2 #	1	3	L004 Negativ kontroll 2 #	7
4	L004 Negativ kontroll 3 #	1	4	L004 Negativ kontroll 3 #	7
5	L004 Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	1	5	L004 Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	7
6	L004 Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	1	6	L004 Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	7
7	L004 Prøve 3 (5 % løsemiddel)	1	7	L004 Prøve 3 (5 % løsemiddel)	7
8	L004 Prøve 4 (50 % løsemiddel)	1	8	L004 Prøve 4 (50 % løsemiddel)	7
9	Reagens kontroll				
10	L004 Negativ kontroll 1 #	3			
11	L004 Negativ kontroll 2 #	3			
12	L004 Negativ kontroll 3 #	3			
13	L004 Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	3			
14	L004 Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	3			
15	L004 Prøve 3 (5 % løsemiddel)	3			
16	L004 Prøve 4 (50 % løsemiddel)	3			



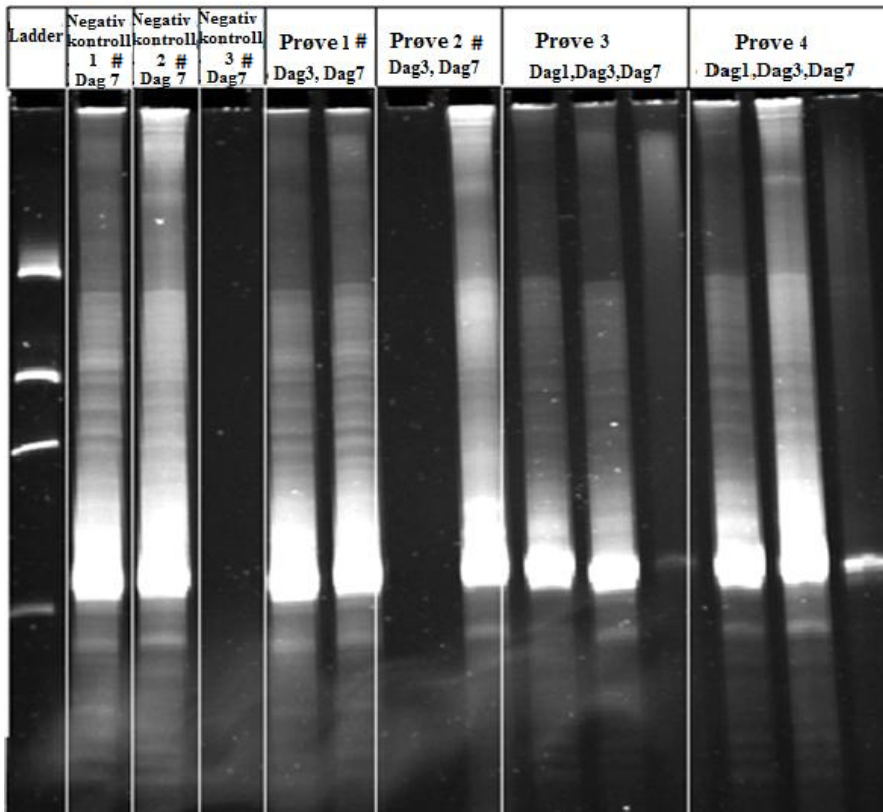
**Figur 46: Agarosegel 1 og 2, L004, forsøk 3.** Gel 1 er vist til venstre og gel 2 til høyre. PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. DNA ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøve-ID er oppført i tabell 22.

Resultater -  
Ristekolbeforsøk 3

---

Agarosegelen vist i figur 46 viser at alle prøvene hadde baseparlengde mellom 400 og 800 basepar og ligger på samme plass. (Forventet baseparlengde med primerne 341 f Bac clamp og 907 r Bac er 606 basepar.)

Agarosegelen viser svake bånd på negativ kontroll 1 og 2, dag 3 og sterke bånd dag 7. Som tidligere nevnt er ikke oljen steril (kap 4.2.3, side 41) og båndfunn kan skyldes mikroorganismer i oljen. Disse kontrollene ble også kjørt på DGGE-gel for å sjekke om det kan sees noen forskjell i biodiversitet mellom negativ kontroll og prøvene tilsatt mikroorganismer. Negativ kontroll 3 er negativ som forventet. I prøvene som ikke er tilsatt mikroorganismer (Prøve 1 og 2), er prøve 1 positiv dag 3 og dag 7 og prøve 2 har et svakt bånd dag 3 og sterkere bånd dag 7. Prøver tilsatt mikroorganismer (Prøve 3 og 4) er positive alle dagene men med svake bånd dag 7.



**Figur 47: DGGE gel 1, L004, forsøk 3.**

PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. DNA-ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøve ID er merket over bildet. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

DGGE-gelen vist i figur 47 viser at negativ kontroll 1 og 2, dag 7 som hadde sterke bånd på agarosegelen, også ga bånd på DGGE-gelen. Biodiversiteten i de negative kontrollene og prøvene er ganske lik. I prøve 3 og 4 (de eneste prøvene som er tilsatt inokulum) kan det se ut som at mikroorganismene dør ut til dag 7. Det kan tenkes at de er blitt utkonkurrert av mikroorganismene i oljen fordi de ikke har kommet opp slik de skulle (siden de er dyrket fra glyserolampuller) eller at det er kontaminering. Det kan tenkes at biodiversiteten som vises i gelen kan komme fra mikroorganismer i oljen eller løsemiddelet siden negativ kontroll 3 ble negativ som forventet og utelukker til en viss grad kontaminering. Som tidligere nevnt kan det ikke utelukkes at løsemiddelet kan ha bidratt til kontaminering. Dette burde vært sjekket ved å analysere kun løsemiddel og mineralmedium.

**b) Prøveserie med inokulum ML**

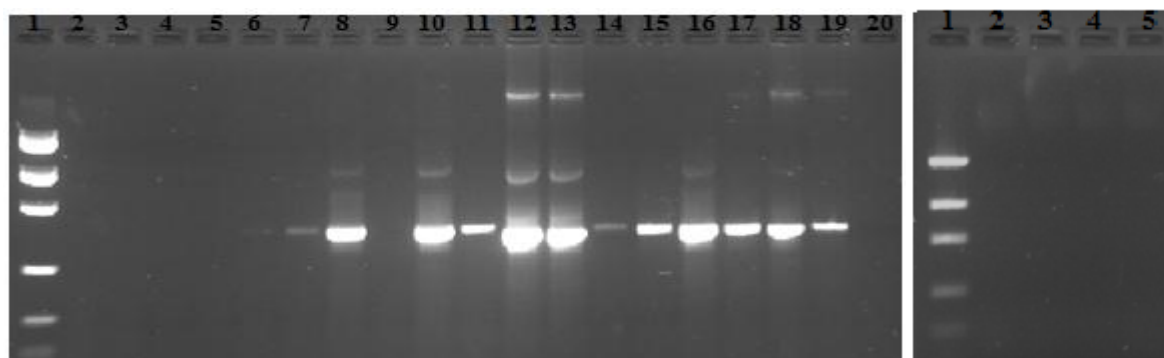
PCR-produktene fra DNA i vannfasen til ristekolbeneserien tilsatt inokulum L004 er vist i figur 48 med tilhørende prøve-ID i tabell 23.

For å få en indikasjon på biodiversiteten til mikroorganismene ble PCR-produktene så kjørt på DGGE (figur 49).

**Tabell 23: Brønnoppsett agarosegel 3 og 4, ristekolbeforsøk 3**

Prøvene er sortert på inokulum ML og kronologisk for prøvetakningsdag. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

Brønn	Prøve	Dag	Brønn	Prøve	Dag
<b>Gel 3</b>			<b>Gel 4</b>		
1	Ladder		21	Ladder	
2	ML Negativ kontroll 1 #	1	22	ML Negativ kontroll 3 #	1
3	ML Negativ kontroll 2 #	1	23	ML Negativ kontroll 3 #	3
4	ML Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	1	24	ML Negativ kontroll 3 #	7
5	ML Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	1	25	Blank	
6	ML Prøve 3 (5 % løsemiddel)	1			
7	ML Prøve 4 (50 % løsemiddel)	1			
8	ML Negativ kontroll 1#	3			
9	ML Negativ kontroll 2 #	3			
10	ML Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	3			
11	ML Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	3			
12	ML Prøve 3 (5 % løsemiddel)	3			
13	ML Prøve 4 (50 % løsemiddel)	3			
14	ML Negativ kontroll 1 #	7			
15	ML Negativ kontroll 2 #	7			
16	ML Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	7			
17	ML Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	7			
18	ML Prøve 3 (5 % løsemiddel)	7			
19	ML Prøve 4 (50 % løsemiddel)	7			
20	Reagens kontroll				



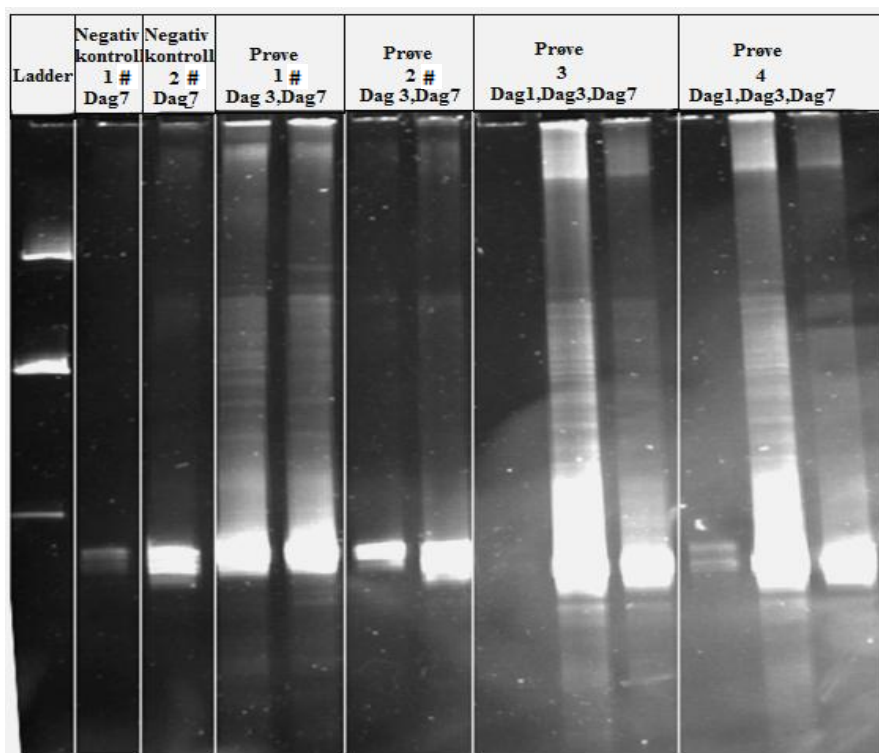
**Figur 48: Agarosegel 3 og 4, ML, forsøk 3.**

PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. Gel 3 er vist til venstre og gel 4 er vist til høyre DNA ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøve ID er oppført i tabell 23.

## Resultater - Ristekolbeforsøk 3

Agarosegelen vist i figur 48 viser at alle prøvene hadde baseparlengde mellom 400 og 800 basepar og ligger på samme plass, men det er dannet noen spesifikke bånd over forventet baseparlengde. Negativ kontroll 1 og 2 har bånd dag 7 på agarosegelen. Som tidligere nevnt er ikke oljen steril (kap 4.2.3, side 41) og båndfunn kan skyldes mikroorganismer i oljen. Negativ kontroll 3 dag 1, 3 og 7 er negativ som forventet.

Angående prøvene som ikke er tilsatt mikroorganismer (Prøve 1 og 2), så er prøve 1 positiv dag 3 og 7 og prøve 2 positiv dag 7. Dette kan skyldes bidrag fra mikroorganismene i oljen. Prøver tilsatt mikroorganismer (Prøve 3 og 4) er positive alle dagene. På dag 3 og dag 7 har disse prøvene fått spesifikke bånd i tillegg til det forventede båndet med baseparlengde rundt 606 basepar.



**Figur 49: DGGE gel 1, ML forsøk 3.**

PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac clamp/907 r Bac. DNA-ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. Prøve ID er merket over bildet. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

DGGE-gelen vist i figur 49 viser at negativ kontroll 1 og 2 dag 7 som fikk bånd på agarosegelen, fikk svake bånd på DGGE. Prøve 1 har høy biodiversitet dag 3 og 7, mens prøve 2 har lav biodiversitet dag 3 og 7. Etersom tidligere prøver har vist at oljen mest sannsynlig bidrar med mikroorganismer, kan dette indikere at de har vokst på mineralmediet og løsemiddelet, men at 50 % løsemiddel har påvirket veksten negativt til de mikroorganismene som eventuelt er tilstede i oljen.

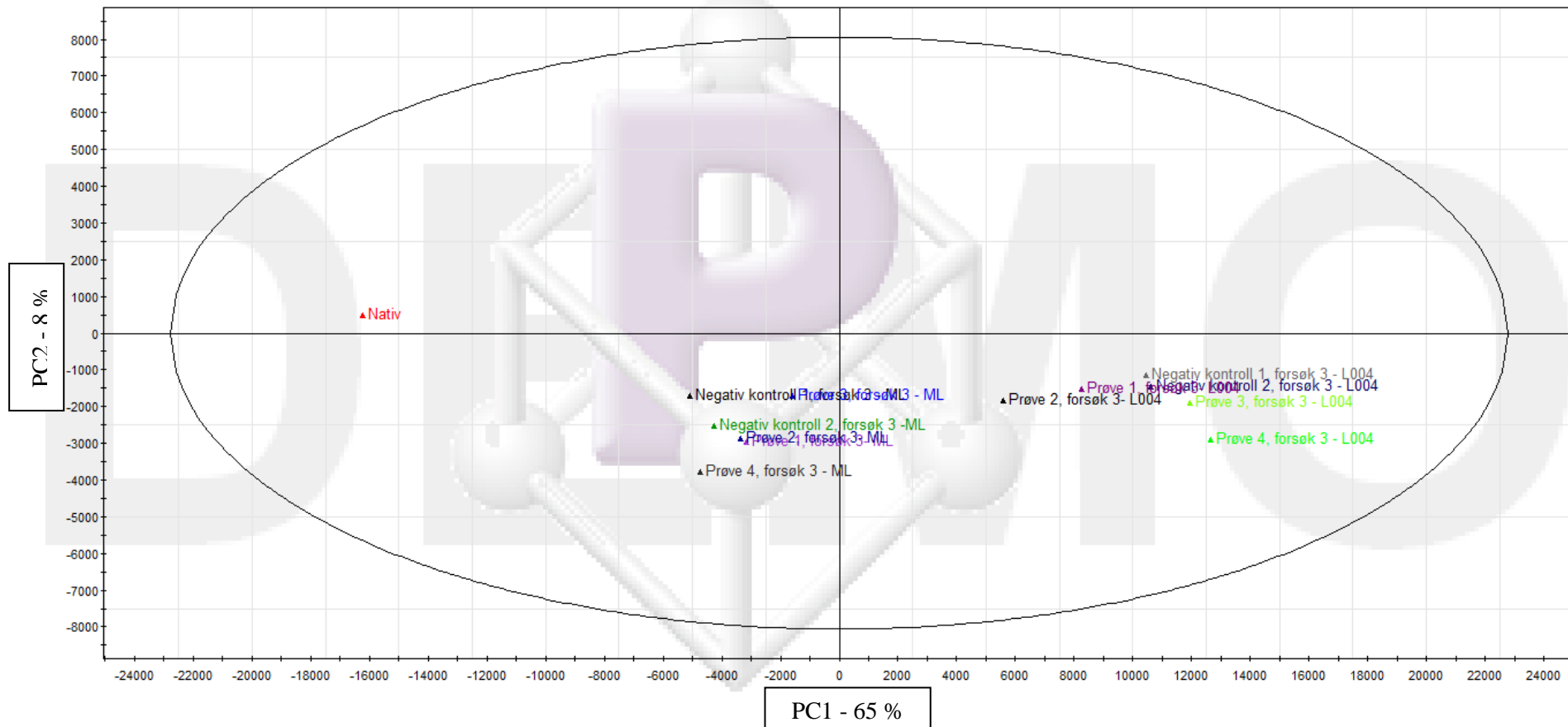
Prøve 3 viser ikke bånd på DGGE dag 1, noe som kan skyldes svake DNA-konsentrasjoner. Prøve 4, dag 1 viser svake bånd på DGGE. Dag 3 mot dag 7 i prøve 3 og 4 viser færre bånd, noe som kan tyde på at noen av mikroorganismene ikke har overlevd til dag 7. DNA kunne vært tilstede i prøven selv om mikroorganismene ikke har overlevd men dette er avhengig om det er enzymer tilstede (DNAser) som bryter ned DNA og hvor raske dette skjer. Det er også biodiversitetsforskjell mellom negativ kontroll med olje og prøvene som kun er tilsatt løsemiddel og olje; prøve 1 og 2 mot prøvene som er tilsatt mikroorganismer og olje, prøve 3 og 4. Det kan være forskjellige arter som er tilstede i ristekolbene med kun olje, i forhold til kolbene med olje og løsemiddel, og de med olje og inokulum.



#### 4.3.7. ESI-MS, ristekolbeforsøk 3

##### Likhet og forskjeller mellom spektra i ristekolbeforsøk 3

Likhet og forskjeller mellom spektra i ristekolbe forsøk 3 ble evaluert med PCA, ved hjelp av Simca P+ 12.1 og er vist i figur 50. Dette ble gjort for prøve å se om de negative kontrollene skilte seg fra prøvene med løsemiddel og prøvene med løsemiddel og inokulum.



**Figur 50: Multivariat ved hjelp av SIMCA multivariat program for å vise sammenheng mellom nativ olje og prøvene i forsøk 2**

Figuren viser et PCA-plott av oljeprøvene i forsøk 3 med SIMCA multivariat-analyse.

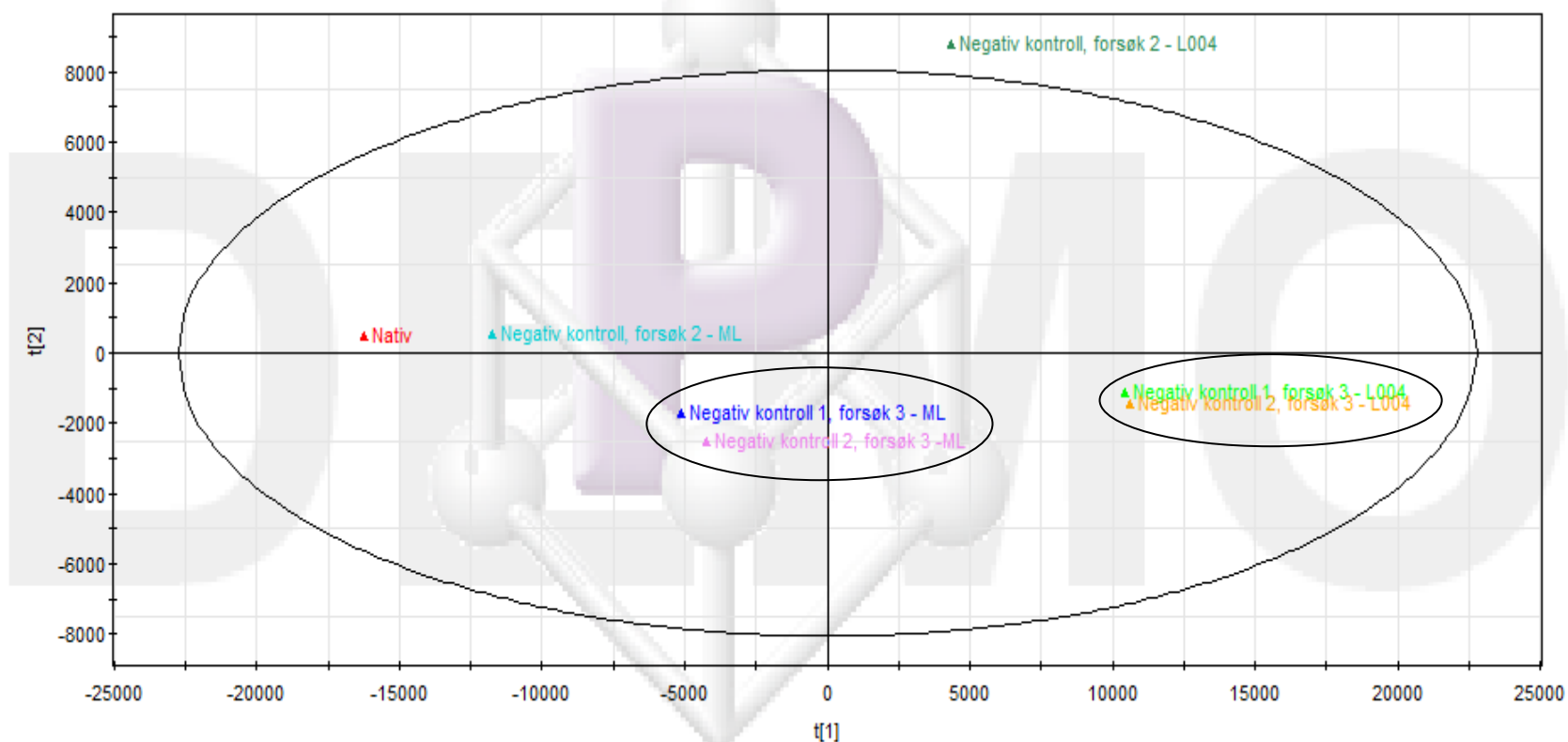
X-aksen viser "principal component 1" som forklarer 65 % variasjon i prøvene. Y-aksen viser "principal component 2" som forklarer 8 % variasjon i prøvene. Nativ olje er ubehandlet olje.

Figur 50 kan indikere at de negative kontrollene og prøvene med løsemiddel er svært like. Dette kan antyde at løsemiddelet ikke har en stor påvirkning på oljen. Det er vanskelig si noe om hvor stor grad prøver med løsemiddelet skiller seg fra prøver med løsemiddel og inokulum, siden inokulum L004 og ML ikke har fungert på samme måte som i forsøk 2 (graderingstabell, kap 4.2.2, side 38).

Det er ikke store variasjoner innad i prøveseriene med inokulum L004 og ML, men her sees det igjen en tendens til at temperaturen har en innvirkning på oljen. Dette kan sees ved at oljefraksjonene i prøveserie L004 og ML har stor variasjon mellom hverandre. Prøveserien med inokulum L004 kjørt ved 60 °C skiller seg mest fra nativ olje.

Sammenligning av prøvene i forsøk 2 og 3 kunne vist hvilke forskjeller det er mellom tilsetning av kun løsemiddel, mot løsemiddel og inokulum. For å kunne sammenligne forsøk 2 mot forsøk 3, bør de negative kontrollene vise noenlunde samme resultat. Som vist i figur 51 kan man se at negativ kontroll 2, forsøk 2, fra prøveserie L004, skiller seg ut fra de andre prøvene. Det er derfor ikke grunnlag for å sammenligne forsøk 2 og 3.

## Resultater - Ristekolbeforsøk 3



**Figur 51: Multivariat ved hjelp av SIMCA multivariat program for å vise sammenheng mellom nativ olje og prøvene i forsøk 2**

Figuren viser et PCA-plott av oljeprøvene i forsøk 2 med SIMCA multivariat-analyse.

X-aksen viser "principal component 1" som forklarer 65 % variasjon i prøvene. Y-aksen viser "principal component 2" som forklarer 8 % variasjon i prøvene. Nativ olje er ubehandlet olje. De sirklede kontrollene er paralleller i prøveseriene L004 og ML.

#### 4.3.8. Samletabell, ristekolbeforsøk 3

En samletabell ble laget for å prøve å se resultatene fra de ulike analysemetodene i en sammenheng og er vist i tabell 24.

Tabellen er basert på de ulike metodene og deres resultat. Positiv agarose- og DGGE gel betyr at det ble funnet bånd som tyder på økt biodiversitet dag 3 og dag 7. Resultatene fra ESI-MS er vist ved grad av endring i oljekomponentene basert på sammenligning mellom negativ kontroll og prøver ved hjelp av PCA analyse.

##### **Tabell 24: Samletabell over resultater fra ristekolbeforsøk 3.**

Tabellen er basert på de ulike metodene og deres resultat. Positiv agarose- og DGGE gel betyr at det ble funnet bånd som tyder på biodiversitet. Prøver merket med stjerne (\*) betyr at prøvene ikke er kjørt på DGGE pga. negativt resultat på agarosegel, som også ville blitt negative på DGGE- gel. Resultatene fra ESI-MS er vist ved grad av endring i oljekomponentene basert på sammenligning mellom negativ kontroll og prøver ved hjelp av PCA analyse.. Prøvene merket med (§) er ikke kjørt på DGGE selv om den ble positiv på agarosegelen. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum. Prøver merket med strek (-) er ikke tatt med i vurdering til ESI-MS prøver da disse er negativ kontroller.

Ristekolbeforsøk 3 L004	Visuell gradering	Agarosegel			DGGE			ESI-MS	Kommentar
		Dag 1	Dag 3	Dag 7	Dag 1	Dag 3	Dag 7		
Negativ kontroll 1 #	2+	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ *	Negativ *	Positiv	-	Mistanke om kontaminering eller bidrag fra mikroorganismer i oljen
Negativ kontroll 2 #	1+/2+	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ *	Negativ *	Positiv	-	Mistanke om kontaminering eller bidrag fra mikroorganismer i oljen
Negativ kontroll 3 #	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ *	Negativ *	Negativ	-	Negativ som forventet
Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	3+/4+	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ *	Positiv	Positiv	Svak endring	Liten endring i oljefraksjonene
Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	2+	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ *	Negativ	Positiv	Svak endring	Liten endring i oljefraksjonene
Prøve 3 (5 % løsemiddel)	1+/2+	Positiv	Positiv	Svakt positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Svak endring	Liten endring i oljefraksjonene
Prøve 4 (50 % løsemiddel)	1+/2+	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Positiv	Negativ	Svak endring	Liten endring i oljefraksjonene

**Tabellen fortsetter**

Resultater -  
Ristekolbeforsøk 3

**Tabell fortsetter**

<b>Ristekolbeforsøk 3 - ML</b>	<b>Visuell gradering</b>	<b>Agarosegel</b>			<b>DGGE</b>			<b>ESI-MS</b>	<b>Kommentar</b>
		<b>Dag 1</b>	<b>Dag 3</b>	<b>Dag 7</b>	<b>Dag 1</b>	<b>Dag 2</b>	<b>Dag 3</b>		
Negativ kontroll 1 #	2+	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ *	§	Svakt Positiv		Mistanke om kontaminering eller bidrag fra mikroorganismer i oljen
Negativ kontroll 2 #	1+/2+	Negativ	Negativ	Positiv	Negativ *	Negativ *	Svakt Positiv		Mistanke om kontaminering eller bidrag fra mikroorganismer i oljen
Negativ kontroll 3 #	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ	Negativ*	Negativ *	Negativ *		Negativ som forventet
Prøve 1 (5 % løsemiddel) #	3+	Negativ	Positiv	Positiv	Negativ*	Positiv	Positiv	Svak endring	Liten endring i oljefraksjonene
Prøve 2 (50 % løsemiddel) #	3+	Negativ	Positiv	Positiv	Svakt positiv	Svakt positiv	Positiv	Svak endring	Liten endring i oljefraksjonene
Prøve 3 (5 % løsemiddel)	1+	Svakt positiv	Positiv	Negativ	Negativ	Positiv	Positiv	Svak endring	Liten endring i oljefraksjonene
Prøve 4 (50 % løsemiddel)	1+	Positiv	Positiv	Positiv	Svakt positiv	Positiv	Positiv	Svak endring	Liten endring i oljefraksjonene

Resultatene fra alle analysene (vist i tabell 24), viser at olje og løsemiddel ikke gir stor forskjell på oljefraksjonene ved å sammenligne prøvene med negativ kontroll. Inokulumet har ikke fungert slik som det skal og det kan konkluderes med at oppdyrking av mikroorganismer fra glyserolampulle ikke ble vellykket. De negative kontrollene viser at det er mikroorganismer i olje.

## 5. Diskusjon

### *Ristekolbeforsøk 1*

#### Studere løsemiddelets effekt på inokulum.

Resultatene fra ristekolbeforsøk 1 indikerer at både inokulum L004 og ML tåler tilsetningen av løsemiddelblandingen ved konsentrasjoner fra 5-50 % av oljefasen, da det er vekst i alle kolbene tilsatt løsemiddel. Det er vanskelig å si om det er forskjell i mikrobiell vekst ved tilsats av løsemiddel og om ulik konsentrasjon av løsemiddelblandingen gir ulik vekst. Celletelling av vannfasen ved hjelp av mikroskopi kunne gitt et bedre svar på tettheten av mikroorganismer i ristekolbene. Fra DGGE resultatene kan det sees at ML har en høyere biodiversitet enn L004. Det mistenkes at DNA-ekstraksjon mislyktes for inokulum L004 på grunn av lave DNA-konsentrasjoner som vist i vedlegg K-2, tabell K-2-1, side 108. Det er ikke mulig å se forskjell på vekst i ristekolbene som kun er tilsatt inokulum i forhold til ristekolbene som er tilsatt inokulum og løsemiddel.

### *Ristekolbeforsøk 2*

#### Studere inokulumets effekt på oljen ved økende løsemiddelkonsentrasjoner.

Resultatene fra ristekolbeforsøk 2 viste funn av mikroorganismer i DNA prøver fra de negative kontrollene dag 7 i begge prøveseriene (L004 og ML). Det er grunn til å tro at mikroorganismer i oljen eller løsemiddelet vokser opp etter å ha blitt inkubert i 7 dager med mineralmedium.

Forsøk 2 viser at oljen i ristekolbene med inokulum L004 har størst tendens til fysisk endring i forhold til prøveserie med inokulum ML, sett ved visuell gradering. DGGE resultatene viser høy biodiversitet i alle prøvene ved dag 3 og 7 for begge inokula.

Ved å sammenligne spekter fra nativ olje og negativ kontroll kan det sees at det har skjedd en endring i de molekylære fraksjonene i oljen i negativ kontroll. Dette kan bety at det har skjedd en fraksjonell endring på grunn av høy temperatur og risting alene som beskrevet i kapittel 3.3, side 11.

Ut fra ESI-MS resultatene vurdert med multivariat analyse ser det ut til at de to inokula L004 og ML har noe forskjellig virkningsmekanisme. Prøveserien med L004 viser tendens til biokonvertering og at løsemiddelet bidrar til denne effekten. Prøve 4 og 5, fra samme prøveserie, med henholdsvis 30 % og 50 % løsemiddel viser også en liten tendens til å variere fra resten av prøvene. Dette kan indikere at 30 % og 50 % løsemiddel har hatt en større

innvirkning på oljefraksjonene enn prøvene med mindre mengde løsemiddel (prøve 2 og 3) og prøve 1 uten løsemiddel.

Det kan virke som at ML kan ha en biokonverterende effekt ved for eksempel dannelse av biosurfaktanter, men det ser ikke ut til at løsemiddelet bidrar til økt effekt.

### ***Ristekolbeforsøk 3***

#### Studere hvilken effekt løsemiddelet har på oljen.

Visuell gradering i forsøk 3 viser fysisk endring i oljefasen i negativ kontroll 1 og 2 for begge prøveseriene med inokulum L004 og ML, noe som kan bety at det har skjedd en fraksjonell endring på grunn av høy temperatur og risting alene som beskrevet i kapittel 3.3, side 11. Prøve 1 og 2, forsøk 3 med løsemiddel (uten inokulum), viser også en tendens til fysisk endring i oljefasen og dette kan bety at løsemiddelet løser opp oljen til en viss grad, i kombinasjon med høy temperatur og risting. Prøve 3 og 4 i forsøk 3 (tilsatt inokulum fra glyserolampuller) viser en liten tendens til fysisk endring i oljefasen. Derimot ble det ikke like mye endring som forventet i forhold til prøve 1 og 2 (som ikke er tilsatt inokulum). Det var forventet en større endring ettersom inokulumet var tatt fra nedfrost inokulum fra forsøk 2, hvor det ble påvist en tendens til biokonvertering med det samme inokulumet. Dårligere resultat kan skyldes at noen av mikroorganismene ikke har overlevd nedfrysning på glyserol (kap 4.3.6 og 4.3.8).

I mikroskopbildene i ristekolbeforsøk 2 og 3 var det vanskelig å se forskjell på fragmenter fra oljefasen og mikroorganismene. Dette gjorde det vanskelig å anslå mikrobiell vekst og om det vil være noen forskjell med tanke på økende mengde løsemiddelkonsentrasjon. I tillegg var det vanskelig å si noe om løsemiddelet sammen med inokulum hadde en bedre eller dårligere effekt på fraksjonell endring av oljen, i forhold til ved tilsats av kun løsemiddel.

Resultater fra DGGE viser tegn til en noe ulik biodiversitet i negativ kontroll og prøvene som ikke er tilsatt inokulum ML, sammenlignet med prøvene som er tilsatt inokulum ML. Dette kan antyde at mikroorganismer fra oljen har bidratt til DNA-produkt i de første to tilfellene, og at inokulumet kommer til uttrykk i det tredje tilfellet.

Angående prøveserien med L004 viser DGGE tegn til lik biodiversitet i de negative kontrollene, prøvene tilsatt kun løsemiddel og prøvene tilsatt løsemiddel og inokulum.

Det kan tenkes at inokulum L004 har blitt utkonkurrert av mikroorganismene i oljen fordi det ikke har kommet opp som forventet. Dette kan være fordi de er dyrket fra glyserolampuller.

Siden de negative kontrollene tilsatt kun medium og olje, har samme biodiversitet som prøvene tilsatt medium, olje og løsemiddel, kan det kanskje utelukke at det er løsemiddelet som bidrar til kontaminering.

ESI-MS resultatene fra ristekolbeforsøk 3 viser at løsemiddelet også bidrar til oljefordelingen i vannfasen, men trolig ikke like godt som ved tilsats av både inokulum og løsemiddel. Dette antas fordi negativ kontroll er lik prøvene med kun løsemiddel og det kan se ut til at løsemiddelet ikke har noen stor effekt på oljen alene.

### **Generelt**

DNA-konsentrasjonene i alle ristekolbeforsøkene var generelt lave. A260/A280 ratioen for noen av prøvene viste resultater både under og over 1,8, som indikerer at DNA var urent i disse prøvene. A260/A230 ratio for en del av prøvene viste resultater med ratio over og under 2,0-2,2 (se vedlegg K-2, L-4, M-4). Dette kan bety at komponenter fra løsemiddelblandingen eller andre molekylære forbindelser som proteiner eller RNA har kommet over i vannfasen.

Forventet baseparlengde med primerne 341 f Bac clamp og 907 r Bac, er 606 basepar for analyse av 16S rRNA PCR-produkt med clamp, på agarosegel. Det ble i tillegg til bånd med forventet antall basepar, dannet noen uspesifikke bånd i ristekolbeforsøk 1 (med inokulum ML), og ristekolbeforsøk 3 (med inokulum L004 og ML). Det vil si at noe annet enn målproduktet har blitt dannet og at primerene har bundet seg et annet sted enn forventet. Det kan være at primerdesign ikke er optimal og det kan være behov for å redesigne primere, eller det kan være at templatet er ikke rent nok. Hvis ikke A260/A280 ratio er ca. 1,8 bør templatet renses. Hvis det ikke er mulig å rense templatet kan det være hensiktsmessig å prøve å la primerene sitte lengre festet til templatet ved å kjøre trinnet for primerbinding lengre og ved høyere temperatur (optimalisering av PCR-reaksjonen). Hvis det er for lav konsentrasjon av DNA kan eventuelle urenheter spille en større rolle. Det kan tilsettes 5 µl templat, istedenfor 2 µl til mastermix for å øke mengden DNA.<sup>22</sup>

For disse prøvene var A260/A280 ratio dårlig og det ble tilsatt 5 µl templat isteden for 2 µl. Dette bidro ikke til bedre resultat og det ble dannet uspesifikke bindinger. Det antas at mengden prøve ikke ble tilstrekkelig. Flere optimaliseringstrinn som listet ovenfor kunne også ha blitt prøvd ut.

Det er vanskeligere å isolere DNA fra archaea enn bakterier fordi de har tykkere cellevegg.



Trinnet før DNA-isolering inkluderer behandling med lysozym, som skal være tilstrekkelig til å bryte ned celleveggen. Dette har ikke fungert i disse forsøkene og DNA-isolering kunne blitt optimalisert som tidligere nevnt. Tilsetning av bovin serum albumin (BSA) ble også prøvd ut. BSA blokkerer inhiberende faktorer og dette kunne bidratt til et bedre resultat ved ekstraksjon av DNA fra archaea, men dette ga ikke et bedre resultat.

For å få et mer nøyaktig resultat på DGGE-gelene kunne metoden vært optimalisert ved å kjøre en kommersiell standardisert gel.

For å differensiere båndene bedre, kunne det blitt prøvd å forhindre fargestråling ved å sette på mindre mengde prøve på gelen. Siden DNA-konsentrasjonene var lave, var ikke dette et alternativ. DNA-isoleringen eller templatet burde blitt optimalisert som tidligere nevnt og alternativt kunne en mer avansert bildeanalyseprogramvare blitt brukt for å detektere mer presise posisjoner av båndene i gelen (Rf-verdi).<sup>23</sup>

DGGE viser at det er en kombinasjon av flere arter som er tilstede både under og etter biokonvertering i begge inokulum, vist med varierende biodiversitetsmønster.

Detekteringsnivået på oljekomponentene med ESI-MS er en viktig faktor når man skal vurdere oljefragmentene, siden noen av komponentene i oljen ikke kan ioniseres.

Mikroorganismene kan også danne biosurfaktanter som hjelper til med mobiliseringen av oljen og dette vil mest sannsynlig ikke detekteres ved ESI-MS analyse av oljefasen (Christian Collin-Hansen, personlig kommunikasjon, 2011). For å få et bedre bilde på mengde oljefraksjoner som har gått over i vannfasen kunne også vannfasen blitt analysert med massespekteranalyse.

Andre analyser som for eksempel GC-MS kunne også vært brukt til å detektere oljefragmentene, men analysen har sin fordel og ulempe. GC-MS vil for eksempel kunne detektert komponentene i gassfase, men det er vanskelig å detektere komponentene i tung olje siden det er svært kompliserte blandinger. De største komponentene er vanskelige å analysere fordi det er vanskelig å få de til å gå over i gassfase.<sup>22</sup> En mer høyoppløselig detektering ville vist masse per hele molekyl og dette kunne ha gitt en bedre indikasjon på hvilke stoffer det er i prøvene.

Det kan ikke utelukkes at det kan ha skjedd en kontaminering i ristekolbeforsøkene, men ettersom det er en gjentakende trend at negative kontroller (som ikke er tilsatt inokulum) blir positive ved tilsats av olje mistenkes det at det er mikroorganismer som stammer fra oljen. Tidligere har det blitt nevnt at oljen ikke er steril og at mineralmediet vil stimulere til vekst dersom det er mikroorganismer i oljen fra før (kap 4.2.3, side 41).

Ved å se på forskjellene mellom prøveseriene L004 og ML i forsøk 3, at de samler seg i hver sin klynge, virker det som at det er temperaturen som er den viktigste faktoren som spiller inn på endringer i oljefraksjonene i dette forsøket. Dette kan antas ettersom inokula L004 og ML ikke har fungert optimalt som tidligere nevnt (kap 4.2.2, side 38).

Høy temperatur kan stimulere til økt vekst av mikroorganismene i oljen og forskjellig forsøkstemperatur kan forklare forskjellene mellom biodiversiteten i prøveseriene med ML og L004. Ettersom det er biologiske system som brukes, kan man ikke forutsi hvordan disse mikroorganismene vil arte seg fra gang til gang. For å slå fast om oljen er den som bidrar til positive funn, kunne man kjørt en forsøksserie bestående av en rekke ristekolber tilsatt kun olje og mineralmedium, for deretter å analysere dette.

For å forsikre at mikroorganismene i oljen ikke bidrar til biokonverteringen kunne oljen blitt autoklavert før ristekolbeforsøk, men autoklaving ville antageligvis ikke fjernet alt av DNA produkt siden det ikke forsvinner med mindre det hydrolyseres. Likevel, da ville man vært sikrere på hvordan inokulumet alene innvirker på oljen, og at det kun var tilsatt inokulum som sto for en eventuell biokonvertering. En tanke er likevel at det i teorien alltid vil være naturlig forekommende mikroorganismer i en oljebrønn. Disse vil kunne virke inn på tilsatt inokulum og næringsmidler i oljebrønner. Derfor bør et biokonverteringseksperiment tilpasses til hver enkelt brønn.

Oljen kan inneholde en del flyktige komponenter som kan dampe av under autoklaving, noe som i teorien kunne ført til at oljens komposisjon endret seg før biokonverteringsforsøket (Hans Kristian Kotlar, personlig kommunikasjon, 2011).

Et argument mot at autoklaving vil endre oljens komposisjon er at bitumen, som blir brukt i dette forsøket, inneholder svært lave konsentrasjoner av flyktige komponenter. Denne oljen har allerede vært igjennom en mye tøffere oppvarming under produksjonen (til rundt 300 °C), så eventuelle flyktige komponenter er nok allerede dampet av.

Dette kan ha bidratt til å sterilisere oljen (“autoklaving”), men siden oljen sannsynligvis ikke har vært tappet og lagret under sterile betingelser, er det høyst sannsynlig at kontaminering med mikroorganismer har funnet sted. Dette kan ha medført tilførsel av andre

mikroorganismer enn de som fins naturlig i oljen nede i reservoaret. Det faktum at oljens egenskaper neppe ville ha endret seg nevneverdig gjennom et ekstra autoklaveringsstrinn, gir et sterkt argument for å anbefale det i fremtiden (Christian Collin-Hansen, personlig kommunikasjon, 2011).

### *Forslag til videre arbeid*

Det kunne vært interessant å autoklavere oljen og kjørt samme forsøk mot olje som ikke er autoklavert for å se hvilke utslag dette ville hatt. Flere forsøksserier med kun olje og mineralmedium kunne blitt undersøkt for å se hvordan risting og forskjellige temperaturer påvirker oljen alene. Ved ESI-MS analyse kunne dette vist hva temperaturen alene gjør med oljekomponentene.

Det hadde også vært interessant å velge et mineralmedium som ikke er så næringsrikt for å se hvilken påvirkning dette hadde hatt på mikroorganismenes vekst.

Inokula L004 og ML kunne blitt undersøkt i ristekolbeforsøk ved forskjellige temperaturer og med andre typer oljer for å undersøke om dette ville gitt andre vekstvilkår og utfall med tanke på biokonverteringsevne.

Ved å optimalisere DNA-isolering og PCR reaksjonen ville man fått et renere DNA produkt og ingen uspesifikke bånd. Dette kunne bidratt til å få et mer presist resultat ved DGGE-analyser. DGGE-gelene kunne også blitt standardiserer med en kommersiell gel, slik at analyseresultatene hadde hatt et bedre grunnlag for sammenligning.

Paralleller på alle prøvene burde blitt tatt med for å bekrefte resultat.

Under ristekolbeforsøk burde OD av vannfasen blitt målt for å gi en bedre indikasjon på tettheten til mikroorganismene. Samt at det burde blitt gjort en pH-måling for å kunne si noe om eventuelle endringer i vekstforholdet i ristekolbene under ristekolbeforsøk.

Ved å mikroskopere ved høyere oppløsning og utføre celletelling kunne man fått et klarere svar på levedyktigheten til mikroorganismene ved de forskjellige parameterne.

For å være helt sikker på at løsemiddelblandingen var steril kunne prøveserier med løsemiddel og mineralmedium ha blitt undersøkt.

DNA-produkt fra replikerte og vellykkede biokonverteringsseier kunne videre blitt sekvensert for å finne ut hvilke organismer som er tilstede i inokulumet før og etter ristekolbeforsøk.

ESI-MS av vannfasen ville detektert oljekomponenter som har kommet over i vannfasen.

Avslutningsvis kan det sies at resultater fra dette prosjektet viser tendens til at mikroorganismene har en innvirkning på de tunge komponentene i oljen. Sammen med de fysiokjemiske faktorene risting og temperatur, viser inokulum L004 i kombinasjon med løsemiddel, den beste indikasjon på biokonvertering av tyngre oljekomponenter.

Ettersom mikrobielt bidrag fra oljen fortsatt er et spørsmål, burde kontroll på dette vært kjørt for å konkludere om biokonverteringen stammer fra mikroorganismene i oljen, fra tilsatt inokulum eller om dette skyldes en kombinasjon av begge.

## 6. Referanser:

<sup>1</sup> Canadian Association of Petroleum Producers (2011)., *A Revolution in Heavy Oil Technology*. Kilde: Canadian Association of Petroleum Producers. Tilgjengelig fra: <http://www.capp.ca/ENERGYSUPPLY/INNOVATIONSTORIES/WATER/Pages/undergroundCombustion.aspx#6i9ps87FzoRx>. [Nedlastet 30. november 2011]

<sup>2</sup> Kotlar, H. K. (2009). "Can Bacteria Rescue the Oil Industry?" *The Scientist* **23**(2): 30-35.

<sup>3</sup> Alboudwarej, H., Felix, J., Taylor, S., Badry, R., Bremner, C., Brough, B., Skeates, C., Baker, A., Palmer, D., Pattison, K., Beshry, M., Krawchuk, P., Brown, G., Calvo, R., Triana, J.A.C., Hathcock, R., Koerner, K., Hughes, T., Kundu, D., López de Cárdenas, J., West, C. (2006). "Highlighting Heavy Oil." *Schlumberger Oilfield Review* **2**(18): 34-53.

<sup>4</sup> Leon, V., Kumar, M. (2005). "Biological upgrading of heavy crude oil." *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **10**(6): 471-481.

<sup>5</sup> Lazar, I., Petrisor I. G., Yen, T. F. (2007). "Microbial Enhanced Oil Recovery (MEOR)." *Petroleum Science and Technology*, **25** (11): 1353-1366.

<sup>6</sup> Rahimi, P., Gentzis, T. (2006), "The Chemistry of Bitumen and Heavy Oil Processing", Hsu, C.S., Robinson, P.R. (Red.), *Practical Advances in Petroleum Processing*, Springer, New York, s. 149-179.

<sup>7</sup> Head, I. M., Jones, D.M, Larter, S.R. (2003). "Biological activity in deep subsurface and the origin of heavy oil." *Nature* **426**(6964): 344-352.

<sup>8</sup> University of Illinois Chicago (2007), *Model of Asphaltene in Venezuelan Crude; Viscosity & densitie*. Kilde: University of Illinois Chicago. Tilgjengelig fra: <http://www.tekna.no/ikbViewer/Content/19762/Solberg%20-%20Heavy%20Oil.pdf> [Nedlastet 15. mai 2011]

- <sup>9</sup> Sen, R. (2008). "Biotechnology in petroleum recovery: The microbial EOR." *Progress in Energy and Combustion Science* **34**(6): 714-724.
- <sup>10</sup> Thomas, S. (2008). "Enhanced Oil Recovery – An Overview." *Oil & Gas Science and Technology* **63**: 9-19.
- <sup>11</sup> Hogan, C. M. (2010). "Extremophile." Kilde: Encyclopedia of Earth. Tilgjengelig fra: <http://www.eoearth.org/article/Extremophile?topic=49540>. [Nedlastet 16. oktober 2011]
- <sup>12</sup> Research Institute Of Petroleum Industry. (2009). "MEOR: Microscopic displacement." Kilde: Research Institute Of Petroleum Industry. Tilgjengelig fra: <http://www.ripi.ir/index.php?option=content&task=view&id=72>. [Nedlastet 05. mai 2011]
- <sup>13</sup> Brown, L. R. (2010). "Microbial enhanced oil recovery (MEOR)." *Current Opinion in Microbiology* **13**(3): 316-320.
- <sup>14</sup> Jonsen, K. L., Steinbakk, S. H. (2009). "Biokonvertering av tungolje." *Bacheloroppgave, Avdelig for teknologi - HIST*.
- <sup>15</sup> Steinbakk, S. H. (2011). "Bioconversion of Heavy oil - Characterizations of Microbial potential to bioconvert Mariner Maureen-, Peregrino- and Bressay oil". *Masteroppgave, Bioteknologi - NTNU*.
- <sup>16</sup> Gherna R. L., 2002. Culture Preservation, Bacteria, Fungi, Yeast, and Cell Lines. John Wiley & Sons, Inc. (Red.) *Encyclopedia of Bioprocess Technology*., American Type Culture Collection, Rockville, Maryland: 764 s.
- <sup>17</sup> Clark, D. P. (2010). "Molecular Biology." *Elsevier Inc., UK*: 744 s.
- <sup>18</sup> Janda, M. J., Abbott, S.L. (2007). "16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls." *Journal of Clinical Microbiology* **45**(9): 2761-2764.

<sup>19</sup> Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, P. V., Clark, D. P. (2009). "Brock Biology of Microorganisms." *Pearson Education*: 991 s.

<sup>20</sup> Zahlse, K., Eide I., (2005). "A Novel Method for Chemical Fingerprinting of Oil and Petroleum Products Based on Elettrospray Mass Spectrometry and Chemometrics." *Energy & Fuels 2005* **19**: 964-967.

<sup>21</sup> Esbensen, K., Schönkopf, S., Midtgaard, T., (1996). "Multivariate Analysys in Practice". *CAMO A/S*: 306 s.

<sup>22</sup> Roche, (2004) "LightCycler System Quantification Seminar".

<sup>23</sup> Tourlomousis, P., Kemsley, E.K., Ridgway, K.P., Toscano, M.J., Humphrey, T.J., Narbad, A., (2010). "PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of Complex Microbial Communities: A Two-Step Approach to Address the Effect of Gel-to-Gel Variation and Allow Valid Comparisons Across a Large Dataset." *Microbial Ecology* **59**(4): 776-786.

## VEDLEGG

### Innhold

Vedlegg A - Kjemikalier, kit og utstyr.....	81
Vedlegg B - Utdrag fra løsemiddelblanding brukt i Canada .....	84
Vedlegg C – Fremgangsmåte for produksjon av mineralmedium.....	86
Vedlegg D – Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 1.....	89
Vedlegg E – Forsøksoppsett ristekolbeforsøk 1.....	92
Vedlegg F – Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 2.....	93
Vedlegg G- FastDNA® SPIN kit for Soil.....	97
Vedlegg H – Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 3.....	98
Vedlegg I - DNeasy® Blood and Tissue kit.....	102
Vedlegg J - Etterarbeid ristekolbeforsøk.....	104
Vedlegg K - Etterarbeid ristekolbeforsøk 1.....	105
Vedlegg L- Etterarbeid ristekolbeforsøk 2.....	111
Vedlegg M – Etterarbeid ristekolbeforsøk 3.....	118



## Vedlegg A - Kjemikalier, kit og utstyr som ble brukt i ristekolbeforsøkene:

En totaloversikt over metoder og tilhørende kjemikalier, kit og utstyr brukt i ristekolbeforsøkene er vist i tabell A-1, A-2 og A-3.

### A-1. Kjemikalier:

*Tabell A-1: Kjemikalier som ble brukt i ristekolbeforsøkene.*

*Tabellen viser en oversikt over hensikten for bruk av kjemikalier/reagenser, navn på kjemikalier/reagenser og produsent*

<i>Mål</i>	<i>Kjemikalier og reagenser</i>	<i>Produsent</i>
Nedfrysing av inokulum	50 % glyserol	Merc KGaA, Tyskland, Sigma-Aldrich Norge; Kat nr. 33224
Fortynning og ekstrahering av oljeprøver fra kolber	Diklormetan (HPLC grad)	Lab-Scan, Analytical Sciences, Polen
Agarosegelelektroforese	0,5 x TBE	(0,045M Tris, 0,045M borsyre, 1mM EDTA). PRIME, Tyskland
	Agarose	Carl ROTH GmbH, Danmark
	Blue/orange 6 x Gel loading dye	Promega Corporation, Danmark
	SYBR® Safe DNA gel stain	Invitrogen, Life Technologies, USA.
	Low DNA Mass Ladder	Invitrogen, Life Technologies, USA
DGGE	50 x TBE	(0,045M Tris, 0,045M borsyre, 1mM EDTA). PRIME, Tyskland
	40 % Acrylamide/bis	Carl ROTH GmbH, Danmark
	Formamid	Fisher Bioreagents, Thermo Fisher Scientific Inc. USA
	Urea	Invitrogen, Life Technologies, USA
	Ammonium persulfate (APS, 10 %)	Bio-Rad Laboratories INC, USA
	SYBR® Gold nucleic acid stain	Invitrogen, Life Technologies, USA.
	Low DNA Mass Ladder	Invitrogen, Life Technologies, USA
	DNA gel loading buffer, 10 x	Prime, Tyskland
	Denaturerende løsning (20 %)	40 % acrylamide/bis (15 ml, Carl ROTH), 50x TAE-buffer (2 ml, Eppendorf), formamide (8 ml, Fisher BioReagents), Urea (8,4 g, Invitrogen)
	Denaturerende løsning (70 %)	40 % acrylamide/bis (15 ml, Carl ROTH), 50x TAE-buffer (2 ml, Eppendorf), formamide (28 ml, Fisher BioReagents), Urea (29,4 g, Invitrogen)

**A-2. Kit****Tabell A-2: Kit som ble brukt i ristekolbeforsøkene.**

Tabellen viser metoder som ble brukt i ristekolbeforsøkene med tilhørende kit/reagenser/enzymer og produsent av disse

<b>Metode</b>	<b>Kit, reagenser og enzymer</b>	<b>Produsent</b>
DNA isolering - DNeasy® Blood & Tissue kit	DNeasy® Blood & Tissue kit (250)	Qiagen, Tyskland
	50 MM Tris-HCL, pH 8	Sigma-Aldrich, Norge
	Lysozym, 50000 U/mg cryst	Merck KGaA, Tyskland
	0,1 M EDTA, pH 8	FLUKA BioChemica, Sigma Aldrich, Norge
	Tritron - X 100	Kemetyl, Sverige
	Etanol (96 %)	Carl ROTH GmbH, Danmark
DNA isolering - FastDNA® SPINKit for Soil	FastDNA® SPINKit for Soil	MP Biomedicals,
	50 MM Tris-HCL, pH 8	Sigma-Aldrich, Norge
	Lysozym, 50000 U/mg cryst	Merck KGaA, Tyskland
	0,1 M EDTA, pH 8	FLUKA BioChemica, Sigma Aldrich, Norge
	Tritron - X 100	Kemetyl, Sverige
	Etanol (96 %)	Carl ROTH GmbH, Danmark
PCR	PCR buffer, 10x	Qiagen, Tyskland
	dNTP-mix, 10 mM	Qiagen, Tyskland
	HotStarTaq Plus DNA Polymerase	Qiagen, Tyskland

**A-3. Utstyr****Tabell A-3: Utstyr som ble brukt i ristekolbeforsøkene.**

Tabellen viser utstyr som ble brukt i ristekolbeforsøkene, navn på utstyret og produsent.

<i>Utstyr</i>	<i>Navn</i>	<i>Produsent</i>
Brønner	F96 Microwell Plate, Polysterene clear	Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc, USA
	24 Microwell, Nunc Polysterene plate	Nunc, Thermo Fisher Scientific Inc, USA
	V96 Deep well, MASTERBLOCK Storage plate, polypropylene	Greiner-Bio - One International GmbH, Tyskland
Inkuberingskammer	BINDER inkubator	BINDER, GmbH, USA
	Risteinkubator, Multitron	Infors AG, Bottmingen, Sveits
	Risteinkubator, Minitron	Infors AG, Bottmingen, Sveits
Varmeblokk	Grant QBT2	Grant Instruments (Cambridge) Ltd
Sentrifuger	Sentrifuge 5424	Eppendorf, Tyskland
	Sentrifuge 5430R	Eppendorf, Tyskland
	Sentrifuge 5804	Eppendorf, Tyskland
Måling av DNA-konsentrasjon	NanoDrop spektrofotometer, ND - 1000	Thermo Fisher Scientific Inc, USA
PCR-instrument	Mastercycler ep	Eppendorf, Tyskland
Elektroforator	Consort E 132, PowePac Basic	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Elektroforesekammer	Sub-Cell GT System	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
DGGE-instrument	DCODE System	DCODE, Bio-Rad Laboratories Inc, USA
	DCODE System	Bio-Rad Laboratories Inc, USA
Kamera/fotosystem	Bio Imagine System (Gel-Doc)	Syngene, Synoptics Ltd, England
OD-måling	Spektrofotometer FLUOstar Omega	BMG LABTECH GmbH. Offenburg, tyskland
Reinokulering og Standardisering av inokulum	Robotic Workstation 200	Tecan group Ltd, Sveits
Mikroskop og objektiv	Axiophot Zeiss m/20 x Plan-NEOFLUAR objektiv.	Carl Zeiss, Tyskland

## Vedlegg B - Utdrag fra løsemiddelblanding brukt i Canada

Løsemiddel som er brukt i denne oppgaven er en blanding av isopentan, n-pentan, heksan, heptan og oktan.

### B-1 - Løsemiddelblanding.

Et utdrag fra løsemiddelblandingen som brukes i ristekolbeforsøkene utført i Norge og Canada er vist i tabell B-1-1 og kalkuleringssegenskapene til løsemiddelet er vist i tabell B-1-2. Beregningene for å få løsemiddel i ml og prosent er vist i vedlegg B-2.

#### Tabell B-1-1: Løsemiddelblanding.

Tabellen viser en oversikt over en løsemiddelblanding som blir brukt i ristekolbeforsøk i Norge og Canada.

Navn	Kjemisk symbol	Mol fraksjon	Massefraksjon
i-Pentan	i-C <sub>5</sub>	0,2597	0,2272
n-Pentan	n-C <sub>5</sub>	0,2561	0,2241
Heksan	C <sub>6</sub>	0,1710	0,1787
Heptan	C <sub>7</sub>	0,0591	0,0718
Oktan	C <sub>8</sub>	0,0285	0,0395

#### Tabell B-1-2: Løsemidlenes kalkuleringssegenskaper.

Tabellen viser en oversikt over løsemidlenes egenskaper og ble brukt for å kalkulere mengde løsemiddel som skulle tilsettes.

#### Kalkulerings egenskaper

<b>Total Prøve</b>	
Molekylvekt (g/mol)	82,46
Mol fraksjon (mol %)	0,2597
Tetthet (g/cc)	0,6720
<b>C<sub>6+</sub> Fraksjon</b>	
Molekylvekt (g/mol)	97,11
Mol fraksjon (mol %)	0,4386
Tetthet (g/cc)	0,7400
<b>C<sub>7+</sub> Fraksjon</b>	
Molekylvekt (g/mol)	105,89
Mol fraksjon (mol %)	0,2542
Tetthet (g/cc)	0,7738

**B-2 Løsemiddelberegning:**

Løsemiddel mengde beregnet ut fra tetthet, molekylvekt og molfraksjon fra tabell B-1-1 og B-1-2.

Formel for utregning av ml løsemiddel:

$$\text{Tetthet} \left( \frac{g}{ml} \right) \times \text{Molekylvekt} \left( \frac{g}{mol} \right) \times \text{Molfraksjon (mol)} = ml$$

Isopentan:

$$\frac{1 \text{ ml}}{0,6720 \text{ g}} \times \frac{82,46 \text{ g}}{\text{mol}} \times 0,2597 \text{ mol} = 31,87 \text{ ml}$$

N-pentan

$$\frac{1 \text{ ml}}{0,6720 \text{ g}} \times \frac{82,46 \text{ g}}{\text{mol}} \times 0,2561 \text{ mol} = 31,43 \text{ ml}$$

Heksan:

$$\frac{1 \text{ ml}}{0,7400 \text{ g}} \times \frac{97,11 \text{ g}}{\text{mol}} \times 0,1710 \text{ mol} = 22,44 \text{ ml}$$

Heptan:

$$\frac{1 \text{ ml}}{0,7738 \text{ g}} \times \frac{105,89 \text{ g}}{\text{mol}} \times 0,0591 \text{ mol} = 8,09 \text{ ml}$$

Oktan:

$$\frac{1 \text{ ml}}{0,7738 \text{ g}} \times \frac{105,89 \text{ g}}{\text{mol}} \times 0,2285 \text{ mol} = 3,90 \text{ ml}$$

Totalvolum løsemiddel er nå 97,72 ml. For 100 ml løsemiddel, se tabell B-2-1.

**Tabell B-2-1: Totalvolum løsemiddel per 100 ml.**

Tabellen viser mengde (i prosent) av hvert løsemiddel til en blanding på 100 ml.

<b>Løsemiddel</b>	<b>Prosent</b>	<b>Antall ml</b>
<b>Isopentan</b>	32,61 %	32,61 ml
<b>N-pentan</b>	32,16 %	32,16 ml
<b>Heksan</b>	22,96 %	22,96 ml
<b>Heptan</b>	8,28 %	8,28 ml
<b>Oktan</b>	3,99 %	3,99 ml
<b>Totalvolum</b>	100 %	100,00 ml

## Vedlegg C - Fremgangsmåte for produksjon av mineralmedier

Medium brukt i denne oppgaven var beriket mineralmedium med acetat og gjærekstrakt (RMMAcYE), mineralmedium med acetat og gjær (MMAcYE) og mineralmedium (MM).

Mediene ble laget før hvert av de tre ristekolbefersøkene og komplettert med TMS, vitaminer og fosfatløsning som beskrevet i tabell C-1.

### Tabell C-1: Oppskrift mineralmedium.

Tabellen viser en oversikt over kjemikaliene med kjemisk formel som ble tilsatt i de ulike mediene (RMMAcYE, MMAcYE og MM) som ble brukt i ristekolbefersøkene. Kjemikalie merket med strek (-) er ikke tilsatt i det aktuelle medium. Volum er oppgitt i g/l.

Kjemikalie	Kjemisk formel	RMMAcYE	MMAcYE	MM
Ammoniumnitrat	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0,9 g	0,9 g	0,9 g
Kalsiumklorid (dihydrat)	CaCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O	0,05 g	0,05 g	0,05 g
Magnesiumsulfat (heptahydrat)	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Natriumacetat (dihydrat)	NaC <sub>2</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub> x 2H <sub>2</sub> O	8,3 g	8,3 g	-
Gjær	YE	0,5 g	0,5 g	-
Trypton	T	0,5 g	-	-
Pepton	P	0,5 g	-	-
MQ vann / RO-vann		900 g	900 g	900 g

Kjemikaliene blandes i Milli-Q vann (MQ-vann) i en flaske (1L) og pH justeres til 7,5 med 1 M NaOH og løsningene autoklaveres i 20 minutt ved 120 °C. Etter autoklaving skal mediet kompletteres (tabell C-2).

### Tabell C-2: Tilsats for komplettering av medium.

Tabellen viser løsningene som blir tilsatt for å komplettere medium. Mengde løsning tilsatt per liter løsning medium.

Løsning	Mengde (ml/l)
Vitaminer 1:100	1 ml
TMS 1:1:1	3 ml
Fosfatløsning	100 ml

Autoklavert fosfatløsning (100 ml per liter komplett medium, tabell C-3), autoklavert sporminerallosning (TMS; 1:1:1, 3 ml per liter medium, tabell C-4) og sterilfiltrert vitaminløsning (fortynnet 1:100, 1 ml per liter medium, tabell C-5) tilsettes etter mineralmedium er autoklavert.

**Tabell C-3: Oppskrift fosfatløsning**

Tabellen viser innhold i fosfatløsning som tilsettes mediet. Mengden som blir tilsatt er oppgitt i g/l

<i>Kjemikalie</i>	<i>Kjemisk formel</i>	<i>g/l</i>
<b>Dinatriumhydrogenfosfat</b>	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	30,6 g
<b>Dikaliumhydrogenfosfat</b>	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	15,2 g
<b>MQ vann / RO-vann</b>		1000 g

**Tabell C-4: Innhold spormetalløsning TMS (1:1:1)**

Tabellen viser innhold i spormetalløsning som tilsettes mediet.

<i>Spormetalløsning (TMS)</i>	<i>Innhold</i>	<i>Volum</i>
Spormetalløsning 1 (TMS 1)	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,00 g/l
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,39 g/l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,44 g/l
	$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,15 g/l
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 g/l
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,02 g/l
	Ionebyttet vann	950,00 ml
	Konsentrert HCL	50,00 ml
Spormetalløsning 2 (TMS 2)	$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	2042,20 mg/l
	NaF	445,50 mg/l
	$\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5651,70 mg/l
	NaIO <sub>3</sub>	47,90 mg/l
	$\text{KAl}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	180,70 mg/l
	$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10,90 mg/l
	Ionebyttet vann	950,00 ml
	Konsentrert HCL	50,00ml
Spormetalløsning 3 (TMS 3)	$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	346,80 mg/l
	$\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	101,40 mg/l
	V <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	18,00 mg/l
	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	14,00 mg/l
	$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,60 mg/l
	Ionebyttet vann	950,00 ml
	Konsentrert HCL	50,00 ml

Løsningene TMS 1, 2 og 3 ble laget av ansatte på Statoil og blandet i forholdet 1:1:1.

Løsningen ble autoklavert og tilsatt i komplett mineralmedium (3 ml/l)

**Tabell C-5: Innhold vitaminløsning**

Tabellen viser kjemikaliene i vitaminløsningen som tilsettes mediet. Mengden som blir tilsatt er oppgitt i g/l og ml/l

<b>Kjemikalie</b>	<b>Mengde (g/l)/ Volum (ml/l)</b>
Biotin	2,00 g/l
Folsyre	2,00 g/l
Pyridoksin-HCL	10,00 g/l
Tiamin-HCL * 2H <sub>2</sub> O	5,00 g/l
Riboflavin	5,00 g/l
Nikotinsyre	5,00 g/l
p-aminobensoat syre	0,10 g/l
Vitamin B12 eller Cyanocobalamin	5,00 g/l
Liponsyre	5,0 g/l
Ionebyttet vann	1000,00 ml

Vitaminløsning med 1:100 fortykning ble laget og overført til ampuller (1 ml). Dette var tidligere laget av ansatte på Statoil. Vitaminløsningen ble sterilfiltrert før bruk og 1 ml ble tilsatt mineralmediet



## Vedlegg D - Fremgangsmåte ristekolbeforsøk 1

### D-1. Forberedelser:

Nedfryste inokulum (ML og L004) på 96-brønnsplater ble tint OD<sub>660nm</sub> ble målt på spektrofotometer (L004 er vist i tabell D-1-1 og ML er vist i tabell D-1-2).

#### Tabell D-1-1: Originalplate L004,

Absorbans er vist som OD ved 660 nm, OD>0,05 indikerer tilstrekkelig vekst av mikroorganismer.

Tall merket med rødt indikerer tilstrekkelig vekst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,802	0,837	0,077	0,127	0,575	0,763	0,738	0,726	0,644	0,856	0,940	0,702
B	0,674	0,365	0,391	0,259	0,041	0,619	0,441	0,669	0,437	0,496	0,437	0,106
C	0,423	0,211	0,318	0,459	0,585	0,337	0,779	0,274	0,579	0,904	0,976	0,103
D	0,054	0,050	0,470	0,241	0,625	0,581	0,448	0,853	0,524	0,428	0,563	0,147
E	0,600	0,259	0,415	0,062	0,241	0,444	0,736	0,802	0,474	0,577	0,382	0,317
F	0,773	0,339	0,254	0,823	0,070	0,101	0,474	0,074	0,598	0,521	0,400	0,183
G	0,054	0,089	0,105	0,625	0,397	0,553	0,057	0,818	0,646	0,373	0,078	0,100
H	0,356	0,103	1,592	0,304	0,055	0,060	0,056	0,493	0,475	1,033	0,656	0,324

#### Tabell D-1-2: Originalplate ML,

Absorbans er vist som OD ved 660 nm, OD>0,05 indikerer tilstrekkelig vekst av mikroorganismer.

Tall merket med rødt indikerer tilstrekkelig vekst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,028	0,027	1,311	0,723	1,116	1,154	1,083	1,145	1,142	1,195	0,524	0,539
B	0,027	1,261	1,329	0,428	1,128	0,574	0,091	1,499	0,841	0,684	0,622	2,023
C	0,025	0,027	0,623	0,880	1,192	1,202	1,187	2,183	0,625	1,320	0,580	0,553
D	0,027	0,026	0,192	0,923	1,127	1,200	0,466	1,139	0,558	0,572	0,529	0,577
E	0,027	1,260	1,241	0,939	1,166	0,463	1,123	0,502	2,073	0,744	0,589	0,530
F	1,015	0,027	1,270	1,341	1,212	0,580	1,713	2,130	1,265	0,645	0,576	0,525
G	1,292	1,276	1,168	1,204	1,210	2,130	2,052	1,166	2,226	0,665	0,702	0,525
H	1,479	1,290	1,266	1,278	1,315	0,640	0,450	1,799	0,590	0,549	0,627	1,230

**D-2. Dag 1:**

Inokulum (20 µl) ble reinokulert for oppdyrking i en 96- dypbrønnsplate som var tilsatt beriket mineralmedium, RMMAcYE (800 µl) L004 ble inkubert i fire dager og ML i én dag ved henholdsvis 60 °C og 35 °C ved 800 RPM og med 56 % fuktighet i et inkuberingskap

Det ble tatt av 200 µl oppdyrket inokulum fra L004 og ML som ble overført til to nye, respektive 96-brønnsplater. OD<sub>660nm</sub> ble målt av de reinokulerte platene (L004 er vist i tabell D-2-1 og ML er vist i tabell D-2-2). Dette ble gjort for å sammenligne OD fra den reinokulerte platen med originalplaten (L004 vist i tabell D-1-1 og ML vist i tabell D-1-2) for å forsikre tilstrekkelig vekst av mikroorganismer.

**Tabell D-2-1: Reinokulert plate etter oppdyrking fra originalplate L004,**

Absorbans er vist som OD ved 660 nm, OD>0,05 indikerer tilstrekkelig vekst av mikroorganismer.

Tall merket med rødt indikerer tilstrekkelig vekst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,606	0,630	0,534	0,065	0,599	0,996	0,538	0,459	0,587	0,649	0,429	1,932
B	0,074	0,484	0,073	0,067	0,053	0,625	0,443	0,432	0,475	0,316	0,620	0,056
C	0,073	0,073	0,176	0,074	0,372	0,821	0,064	0,074	0,535	0,488	0,076	1,724
D	0,053	0,051	0,556	0,290	0,470	0,527	0,430	0,435	0,399	0,482	0,676	0,711
E	0,081	0,069	0,540	0,051	0,054	0,906	0,065	0,457	0,524	0,547	0,066	1,451
F	0,622	0,068	0,244	0,524	0,051	0,058	0,059	0,050	0,504	0,499	0,071	0,053
G	0,087	0,066	0,056	0,104	1,158	0,998	0,058	0,502	0,351	0,401	0,055	0,054
H	0,023	0,125	0,220	0,093	0,082	0,088	0,065	0,081	0,351	0,558	0,081	0,638

**Tabell D-2-2: Reinokulert plate etter oppdyrking fra originalplate L004,**

Absorbans er vist som OD ved 660 nm, OD>0,05 indikerer tilstrekkelig vekst av mikroorganismer.

Tall merket med rødt indikerer tilstrekkelig vekst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,025	0,025	1,214	0,939	2,111	1,412	1,481	1,681	1,498	1,510	0,389	0,278
B	0,025	1,445	1,420	0,946	1,319	0,386	1,275	1,756	1,267	0,797	2,296	1,946
C	0,026	0,025	1,185	0,913	1,421	1,198	1,533	2,100	0,384	1,476	0,701	0,189
D	0,022	0,024	0,907	1,909	1,100	1,734	0,446	1,482	0,462	0,514	0,623	0,443
E	0,025	1,471	1,463	1,353	1,322	0,701	1,197	0,427	2,010	2,059	0,473	0,469
F	1,042	0,135	1,401	1,585	1,323	0,613	2,026	2,100	1,512	0,472	0,396	0,432
G	1,131	1,463	1,377	1,324	1,380	1,865	2,317	1,255	1,898	0,047	0,330	0,509
H	1,442	1,473	1,376	1,379	1,355	0,535	0,592	1,819	0,328	0,334	0,400	1,517

Inokulumet ble standardisert ved hjelp av en robot (Robotic Workstation 200, Tecan). Roboten overførte relativ mengde til åtte sterile rør (ROTH) fra hver av 96- brønnene for å gi lik OD-verdi fra hver brønn basert på OD-målingene til L004 og ML. Hver brønn bidrar nå like mye til det standardiserte inokulumet.

De åtte rørene ble så slått sammen i to nye rør (Sarstedt) for L004 og ML og OD<sub>660nm</sub> ble målt (L004 ble målt til 1,089 OD/0,2 ml og ML ble målt til 1,276 OD/0,2 ml). Inokulumet ble så sentrifugert (Eppendorf 5804; 4000 RPM, 25 minutter) og vasket med MM (L004 ble tilsatt 10,2 ml og ML ble tilsatt 20,2 ml) for å få bort overflødig vekstmedium. OD av inokulumet ble så målt igjen. L004 ble målt til 0,352 OD<sub>660nm</sub> og ML ble målt til 0,911 OD<sub>660nm</sub>.

En prosedyre utviklet ved SINTEF ble brukt for å standardisere OD<sub>660nm</sub> til å bli fortynnet til 1 OD<sub>660nm</sub> = 1 per ml for å gi samme utgangspunkt for begge inokula.

Mengden MM som skulle tilsettes for at OD<sub>660nm</sub> = 1/ml ble beregnet (formel 1). Mikrobemengden i hver kultur var nå lik og biokonverteringsgraden kunne sammenlignes

### D-3 Formler for tilsatt mengde mineralmedium

#### *Formel 1: Tilsatt mengde MM*

$$\frac{1 \text{ OD/ml} \times 15 \text{ ml (ønsket sluttvolum)}}{\text{Målt OD/0,2 ml (Brønnplatevolum)} \times 5} = \text{Ml bakterieløsning fra originalrør} \rightarrow$$

$$15 \text{ ml MM} - \text{Ant ml utregnet bakterieløsning} = \text{MM mengde som skal tilsettes}$$

## Vedlegg E – Ristekolbeforsøk 1

### E-1 Forsøksoppsett, ristekolbeforsøk 1

**Tabell E-1: Innhold ristekolbeforsøk 1**

Tabellen viser kolbenes innhold i ristekolbeforsøk 1, vist som prøvesett for konsortia L004 til venstre og ML til høyre. Hver med type medium, løsemiddel og olje.

Ristekolbeforsøk 1 L004		
Prøver	Innhold	Volum
<b>Negativ kontroll</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml
	L004	0 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 1 0 % løsemiddel</b>	MMAcYe	49 ml
	Løsemiddel	0 ml
	L004	1 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 2 5 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,75 ml
	Løsemiddel	0,25 ml
	L004	1 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 3 15 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,25 ml
	Løsemiddel	0,75 ml
	L004	1 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 4 30 % løsemiddel</b>	MMAcYe	47,5 ml
	Løsemiddel	1,5 ml
	L004	1 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 5 50 % løsemiddel</b>	MMAcYe	46,5 ml
	Løsemiddel	2,5 ml
	L004	1 ml
	Bitumen	0 gram

Ristekolbeforsøk 1 ML		
Prøver	Innhold	Volum
<b>Negativ kontroll</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml
	ML	0 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 1 0 % løsemiddel</b>	MMAcYe	49 ml
	Løsemiddel	0 ml
	ML	1 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 2 5 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,75 ml
	Løsemiddel	0,25 ml
	ML	1 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 3 15 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,25 ml
	Løsemiddel	0,75 ml
	ML	1 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 4 30 % løsemiddel</b>	MMAcYe	47,5 ml
	Løsemiddel	1,5 ml
	ML	1 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 5 50 % løsemiddel</b>	MMAcYe	46,5 ml
	Løsemiddel	2,5 ml
	ML	1 ml
	Bitumen	0 gram

### E-2 - Beregning av mengde glyserol til 20 % sluttløsning

**Formel 2: Beregning av mengde glyserol til 20 % sluttløsning**

$$\frac{20\% \text{ glyserol} \times 1 \text{ ml}}{50\% \text{ glyserol}} = 400 \mu\text{l glyserol} + 600 \mu\text{l inokulum (vannfase)}$$

## Vedlegg F - Ristekolbeforsøk 2

Ristekolbeforsøk 2 ble utført for å sjekke løsemiddelet og inokula L004 og MLs påvirkning på oljen.

### F-1 Forsøksoppsett, ristekolbeforsøk 2

Seks forskjellige parameter ble tatt med i ristekolbeforsøk 2, tabell E-1 viser parameter tatt med i ristekolbeforsøket.

#### Tabell F-1-1: Innhold ristekolbeforsøk 2

Tabellen viser kolbenes innhold i ristekolbeforsøk 2, vist som prøvesett for konsortia L004 til venstre og ML til høyre. Hver med type medium, mengde løsemiddel og olje.

Ristekolbeforsøk 2 L004			Ristekolbeforsøk 2 ML		
Prøver	Innhold	Volum	Prøver	Innhold	Volum
<b>Negativ kontroll</b>	MMAcYe	50 ml	<b>Negativ kontroll</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml		Løsemiddel	0 ml
	L004	0 ml		ML	0 ml
	Bitumen	5 gram		Bitumen	5 gram
<b>Prøve 1 0 % løsemiddel</b>	MMAcYe	49 ml	<b>Prøve 1 0 % løsemiddel</b>	MMAcYe	49 ml
	Løsemiddel	0 ml		Løsemiddel	0 ml
	L004	1 ml		ML	1 ml
	Bitumen	5 gram		Bitumen	5 gram
<b>Prøve 2 5 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,75 ml	<b>Prøve 2 5 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,75 ml
	Løsemiddel	0,25 ml		Løsemiddel	0,25 ml
	L004	1 ml		ML	1 ml
	Bitumen	5 gram		Bitumen	5 gram
<b>Prøve 3 15 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,25 ml	<b>Prøve 3 15 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,25 ml
	Løsemiddel	0,75 ml		Løsemiddel	0,75 ml
	L004	1 ml		ML	1 ml
	Bitumen	5 gram		Bitumen	5 gram
<b>Prøve 4 30 % løsemiddel</b>	MMAcYe	47,5 ml	<b>Prøve 4 30 % løsemiddel</b>	MMAcYe	47,5 ml
	Løsemiddel	1,5 ml		Løsemiddel	1,5 ml
	L004	1 ml		ML	1 ml
	Bitumen	5 gram		Bitumen	5 gram
<b>Prøve 5 50 % løsemiddel</b>	MMAcYe	46,5 ml	<b>Prøve 5 50 % løsemiddel</b>	MMAcYe	46,5 ml
	Løsemiddel	2,5 ml		Løsemiddel	2,5 ml
	L004	1 ml		ML	1 ml
	Bitumen	5 gram		Bitumen	5 gram

**F-2 Tilsatt olje**

Oljen i ristekolbeforsøk 2 ble tilsatt dag 1 og dag 3, dette ble gjort for å gi inokula en forsmak på oljen. Tabell E-2 viser mengden olje tilsatt dag 1 og dag 3 og sluttvolumet olje i gram og prosent. Ønskelig sluttvolum olje var 5 g og 10 % olje av 50 ml vannfase som var totalvolumet i ristekolbene. Beregning til totalprosent olje er vist i formel 3.

**Tabell F-2: Tilsatt olje ristekolbeforsøk 2, dag 1 og dag 3.**

Tabellen viser en oversikt over volum olje i gram som ble tilsatt i respektive ristekolber dag 1 og dag 3 og totalvolumet i kolbene oppgitt i gram og prosent. Ønskelig sluttvolum olje var 5 g og 10 % olje av 50 ml vannfase som var totalvolumet i ristekolbene. Prosentberegning er vist under tabellen.

<b>L004</b>	<b>Olje dag 1 (g)</b>	<b>Olje dag 3 (g)</b>	<b>Totalvolum (g)</b>	<b>Total prosent olje (%)</b>
<b>Negativ kontroll</b>	0,96	3,61	4,57	9,14
<b>Prøve 1</b>	1,01	3,71	4,72	9,44
<b>Prøve 2</b>	1,06	3,64	4,70	9,40
<b>Prøve 3</b>	1,15	3,97	5,12	10,24
<b>Prøve 4</b>	1,26	3,92	5,18	10,36
<b>Prøve 5</b>	0,95	3,92	4,87	9,74

<b>ML</b>	<b>Olje dag 1 (g)</b>	<b>Olje dag 3 (g)</b>	<b>Totalvolum (g)</b>	<b>Total prosent olje (%)</b>
<b>Negativ kontroll</b>	1,25	3,27	4,52	9,04
<b>Prøve 1</b>	1,08	4,40	5,48	10,96
<b>Prøve 2</b>	1,32	3,74	5,06	10,12
<b>Prøve 3</b>	0,98	3,41	4,39	8,78
<b>Prøve 4</b>	1,05	3,44	4,49	8,98
<b>Prøve 5</b>	1,27	3,76	5,03	10,06

Beregning totalprosent olje:

**Formel 3:**

Totalvolum olje x 100 prosent = Total prosent olje

50 gram

**F-3 Oljefortynning:**

Etter endt ristekolbeforsøk ble oljen skilt fra vannfasen i ristekolbene. Oljen ble vasket fra vannfasen med diklormetan (DCM) og overført til forhåndsveide begerglass og satt til avdamping i 5 dager slik at oljen var eneste bestanddel i begerglassene. Dette ble så veid og totalmengde olje ble beregnet. Oljen ble så tilsatt kjent mengde DCM for å kunne beregne konsentrasjon og fortynning til 1 mg/ml slik at prøvene kunne analyseres med ESI-MS. Formlene som er brukt er formel 4, 5 og 6 som er forklart nedenfor. Beregningene er vist i tabell F-3-1 for ristekolbene med inokulum L004 og tabell E-3-2 for ristekolbene med inokulum ML.

Beregninger:

**Formel 4:**

Konsentrasjon mg/ml:

$$\text{Konsentrasjon olje mg/ml} = \frac{\text{Vekt olje (mg)}}{\text{Tilsatt DCM (ml)}}$$

**Formel 5:**

Konsentrasjon av oljeprøvene som skulle tilsettes til 1,5 ml:

$$\frac{1 \text{ mg/ml} \times 1,5 \text{ ml}}{\text{konsentrasjon prøve i mg/ml}} \times 1000 = \text{Konsentrasjon av olje i } \mu\text{l}$$

**Formel 6:**

Beregning av tilsatt DCM:

$$1500 \mu\text{l} - \text{Konsentrasjon av olje i } \mu\text{l} = 1 \text{ mg/ml i } 1,5 \text{ ml}$$

**Tabell F-3-1: Fortynning av olje til ESI-MS prøver (1mg/ml) med ristekolber som tilhører inokulumet L004.**

Tabellen viser vekt av veid begerglass før skilling av vannfase og olje fra ristekolber, vekt av veid begerglass med olje etter oljen ble skilt fra vannfasen, differansen som gir totalvolumet olje i gram og mg, Tilsats av DCM for å få en flytende løsning med kjent volum (mg/ml) og tilsats av DCM til 1 mg/ml olje per 1,5 ml. Formlene som er nevnt bak overskriftene er beregningene som er brukt. Disse er listet opp under kapittel E-3.

<b>ID</b>	<b>Vekt begerglass (g)</b>	<b>Vekt begerglass med olje (g)</b>	<b>Diff = Vekt olje (g)</b>	<b>Vekt olje (mg)</b>	<b>DMC tilsatt (ml)</b>	<b>Konsentrasjon oljeprøve (mg/ml) (Formel 4)</b>	<b>Fortynning til 1 mg/ml i 1,5 ml (µl) (Formel 5)</b>	<b>Tilsats av DCM (µl) til 1,5 ml (Formel 6)</b>
<b>Negativ kontroll</b>	70,3	73,4	3,1	3100,0	50,0	62,0	24,2	1475,8
<b>Prøve 1</b>	58,3	60,8	2,5	2500,0	50,0	50,0	30,0	1470,0
<b>Prøve 2</b>	68,3	71,2	2,9	2900,0	50,0	58,0	25,9	1474,1
<b>Prøve 3</b>	73,0	76,0	3,0	3000,0	50,0	60,0	25,0	1475,0
<b>Prøve 4</b>	58,0	60,2	2,2	2200,0	50,0	44,0	34,1	1465,9
<b>Prøve 5</b>	59,0	61,6	2,6	2600,0	50,0	52,0	28,8	1471,2
<b>Nativ olje</b>	70,2	71,0	0,8	800,0	50,0	16,0	93,8	1406,3

**Tabell F-3-2: Fortynning av olje til ESI-MS prøver (1mg/ml) med ristekolber som tilhører inokulumet L004.**

Tabellen viser vekt av veid begerglass før skilling av vannfase og olje fra ristekolber, vekt av veid begerglass med olje etter oljen ble skilt fra vannfasen, differansen som gir totalvolumet olje i gram og mg, Tilsats av DCM for å få en flytende løsning med kjent volum (mg/ml) og tilsats av DCM til 1 mg/ml olje per 1,5 ml. Formlene som er nevnt bak overskriftene er beregningene som er brukt. Disse er listet opp under kapittel E-3.

<b>ID</b>	<b>Vekt begerglass (g)</b>	<b>Vekt begerglass med olje (g)</b>	<b>Diff = Vekt olje (g)</b>	<b>Vekt olje (mg)</b>	<b>DMC tilsatt (ml)</b>	<b>konsentrasjon oljeprøve (mg/ml) (formel 4)</b>	<b>Fortynning til 1 mg/ml i 1,5 ml (µl) (formel 5)</b>	<b>Tilsats av DCM (µl) (formel 6)</b>
<b>Negativ kontroll</b>	67,5	70,8	3,3	3300,0	50,0	66,0	22,7	1477,3
<b>Prøve 1</b>	67,7	72,0	4,3	4300,0	50,0	86,0	17,4	1482,6
<b>Prøve 2</b>	67,1	70,7	3,6	3600,0	50,0	72,0	20,8	1479,2
<b>Prøve 3</b>	68,4	70,7	2,4	2400,0	50,0	48,0	31,3	1468,8
<b>Prøve 4</b>	67,3	69,7	2,4	2400,0	50,0	48,0	31,3	1468,8
<b>Prøve 5</b>	57,2	59,0	1,8	1800,0	50,0	36,0	41,7	1458,3



## Vedlegg G - FastDNA<sup>®</sup> SPIN kit for Soil

DNA-prøvene fra ristekolbeforsøk 2 ble isolert med FastDNA<sup>®</sup> SPIN kit for Soil, fremgangsmåten fra kittet er prosedyren som følger med kittet og er vist under:

### Sample Processing:

1. Add up to 500mg of soil to **Lysing Matrix E Tube**.

Due to the vigorous motion of the **FastPrep<sup>®</sup> Instrument**, a significant pressure buildup is observed in the tube. The same and the **Lysing Matrix** should not exceed more than 7/8 of the tube in volume. Leaving space in the tube also improves chances for better homogenization. [See Note 1, page 7.]

### Lysis:

Add **978µl Sodium Phosphate Buffer** and **122µl MT Buffer**. [See Note 1, page 7.]

2. Secure tubes in **FastPrep<sup>®</sup> Instrument** and process for 30 seconds at speed 5.5.
3. Centrifuge **Lysing Matrix E Tubes** at 14,000 xg for 30 seconds. [See Note 1, page 7.]
4. Transfer supernatant to a clean tube. Add **250µl PPS** reagent and mix by shaking the tube by hand 10 times.
5. Centrifuge at 14,000 xg for 5 minutes to pellet precipitate. Transfer supernatant to a clean 15ml tube. (Resuspend **Binding Matrix Suspension** before use.) Add 1ml **Binding Matrix Suspension** to the supernatant.
6. Place on a rotator or invert by hand for 2 minutes to allow binding of DNA to matrix. Place tube in a rack for 3 minutes to allow settling of silica matrix.
7. Remove 500µl of supernatant being careful to avoid settled **Binding Matrix**. Discard supernatant. Resuspend **Binding Matrix** in the remaining amount of supernatant. Transfer approximately 600µl of the mixture to a **SPIN<sup>™</sup> Filter** and centrifuge at 14,000 xg for 1 minute. Empty the catch tube and add the remaining supernatant to **SPIN<sup>™</sup> Filter** and spin again.
8. Add **500µl SEWS-M** to the **SPIN<sup>™</sup> Filter** and centrifuge at 14,000 xg for 1 minute. Decant flow-through and replace **SPIN<sup>™</sup> Filter** in Catch tube. Centrifuge at 14,000 xg for 2 minutes to "dry" the matrix of residual **SEWS-M** wash solution
9. Remove **SPIN<sup>™</sup> Filter** and place in fresh kit-supplied **Catch Tube**. Air dry the **SPIN<sup>™</sup> Filter** for 5 minutes at room temperature.
10. Add **50µl DES** (DNase/Pyrogen Free Water) and gently stir matrix on filter membrane with a pipette tip or vortex/finger flip to resuspend the silica for efficient elution of the DNA. Centrifuge at 14,000 xg for 1 minute to transfer eluted DNA to **Catch Tube**. DNA is now application-ready.

## Vedlegg H - Ristekolbeforsøk 3

Ristekolbeforsøk 3 ble utført for å sjekke løsemiddelets påvirkning på oljen, samt løsemiddel og inokulum L004 og MLs påvirkning på oljen.

### H-1 Forsøksoppsett, ristekolbeforsøk 3

Tabell H-1-1 viser de fire parametere tatt med i ristekolbeforsøk 3. Negativ kontroll 1 og 2 er paralleller.

#### Tabell H-1-1: Innhold ristekolbeforsøk 3

Tabellen viser kolbenes innhold i ristekolbeforsøk 3, vist som prøvesett for konsortia L004 til venstre og ML til høyre. Hver med type medium, løsemiddel og olje.

Prøver	Innhold	Volum
<b>Negativ kontroll 1</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml
	L004	0 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Negativ kontroll 2</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml
	L004	0 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Negativ kontroll 3</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml
	L004	0 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 1 5 % løsemiddel</b>	MMAcYe	49,75 ml
	Løsemiddel	0,25 ml
	L004	0 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Prøve 2 50 % løsemiddel</b>	MMAcYe	47,5 ml
	Løsemiddel	2,5 ml
	L004	0 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Prøve 3 5 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,75 ml
	Løsemiddel	0,25 ml
	L004	1 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Prøve 4 50 % løsemiddel</b>	MMAcYe	46,5 ml
	Løsemiddel	2,5 ml
	L004	1 ml
	Bitumen	5 gram

Prøver	Innhold	Volum
<b>Negativ kontroll 1</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml
	ML	0 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Negativ kontroll 2</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml
	ML	0 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Negativ kontroll 3</b>	MMAcYe	50 ml
	Løsemiddel	0 ml
	L004	0 ml
	Bitumen	0 gram
<b>Prøve 1 5 % løsemiddel</b>	MMAcYe	49,75 ml
	Løsemiddel	0,25 ml
	ML	0 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Prøve 2 50 % løsemiddel</b>	MMAcYe	47,5 ml
	Løsemiddel	2,5 ml
	ML	0 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Prøve 3 5 % løsemiddel</b>	MMAcYe	48,75 ml
	Løsemiddel	0,25 ml
	ML	1 ml
	Bitumen	5 gram
<b>Prøve 4 50 % løsemiddel</b>	MMAcYe	46,5 ml
	Løsemiddel	2,5 ml
	ML	1 ml
	Bitumen	5 gram

## H-2. Tilsatt olje, ristekolbeforsøk 3

Oljen i ristekolbeforsøk 3 ble tilsatt dag 1 og dag 3 som beskrevet i vedlegg E-2 side P. Tabell H-2-1 viser mengden olje tilsatt dag 1 og dag 3 og sluttvolumet olje i gram og prosent. Ønskelig sluttvolum olje var 5 g, som tilsvarte 10 % olje av 50 ml vannfase som var totalvolumet i ristekolbene.

### *Tabell H-2-1: Tilsatt olje ristekolbeforsøk 3, dag 1 og dag 3.*

*Tabellen viser en oversikt over volum olje i gram som ble tilsatt i respektive ristekolber dag 1 og dag 3 og totalvolumet i kolbene oppgitt i gram og prosent. Ønskelig sluttvolum olje var 5 g og 10 % olje av 50 ml vannfase som var totalvolumet i ristekolbene. Prosentberegning er vist under tabell H-2, side 99.*

<i>L004</i>	<i>Olje dag 1 (g)</i>	<i>Olje dag 3 (g)</i>	<i>Totalvolum (g)</i>	<i>Total prosent olje (%)</i>
<b>Negativ kontroll</b>	0,98	3,62	4,60	9,20
<b>Prøve 1</b>	1,11	3,58	4,69	9,38
<b>Prøve 2</b>	1,16	3,68	4,84	9,68
<b>Prøve 3</b>	1,16	3,98	5,14	10,28
<b>Prøve 4</b>	1,28	3,68	4,96	9,92
<b>Prøve 5</b>	0,97	3,89	4,86	9,72

<i>ML</i>	<i>Olje dag 1 (g)</i>	<i>Olje dag 3 (g)</i>	<i>Totalvolum (g)</i>	<i>Total prosent olje (%)</i>
<b>Negativ kontroll</b>	1,75	3,67	5,42	10,84
<b>Prøve 1</b>	1,18	4,42	5,60	11,20
<b>Prøve 2</b>	1,22	3,52	4,74	9,48
<b>Prøve 3</b>	1,48	3,51	4,99	9,98
<b>Prøve 4</b>	1,55	3,74	5,29	10,58
<b>Prøve 5</b>	1,17	3,86	5,03	10,06

**H-3. Oljefortynning, ristekolbeforsøk 3:**

Etter endt ristekolbeforsøk ble oljen skilt fra vannfasen i ristekolbene. Beregningene er vist i tabell H-3-1 for ristekolbene med inokulum L004 og tabell H-3-2 for ristekolbene med inokulum ML.

**Tabell H-3-1: Fortynning av olje til ESI-MS prøver (1mg/ml) med ristekolber som tilhører inokulumet L004, ristekolbeforsøk 3.**

Tabellen viser vekt av veid begerglass før skilling av vannfase og olje fra ristekolber, vekt av veid begerglass med olje etter oljen ble skilt fra vannfasen, differansen som gir totalvolumet olje i gram og mg, Tilsats av DCM for å få en flytende løsning med kjent volum (mg/ml) og tilsats av DCM til 1 mg/ml olje per 1,5 ml. Formlene som er nevnt bak overskriftene er beregningene som er brukt. Disse er listet opp under kapittel F-3, side 95. Merk at negativ kontroll 3 ikke inneholdt olje og er derfor ikke tatt med i denne tabellen.

<b>ID</b>	<b>Vekt begerglass (g)</b>	<b>Vekt begerglass med olje (g)</b>	<b>Diff = Vekt olje (g)</b>	<b>Vekt olje (mg)</b>	<b>DMC tilsatt (ml)</b>	<b>Konsentrasjon oljeprøve (mg/ml) (formel 4)</b>	<b>Fortynning til 1 mg/ml i 1,5 ml (µl) (formel 5)</b>	<b>Tilsats av DCM (µl) til 1,5 ml (formel 6)</b>
<b>Negativ kontroll 1</b>	89,2	91,6	2,4	2400,0	50,0	48,0	31,3	1468,8
<b>Negativ kontroll 2</b>	70,3	75,1	4,8	4800,0	50,0	96,0	15,6	1484,4
<b>Negativ kontroll 3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Prøve 1</b>	70,2	75,1	4,9	4900,0	50,0	98,0	15,3	1484,7
<b>Prøve 2</b>	71,1	72,9	1,8	1800,0	50,0	36,0	41,7	1458,3
<b>Prøve 3</b>	67,2	71,7	4,5	4500,0	50,0	90,0	16,7	1483,3
<b>Prøve 4</b>	58,2	63,0	4,8	4800,0	50,0	96,0	15,6	1484,4

**Tabell H-3-2: Fortynning av olje til ESI-MS prøver (1mg/ml) med ristekolber som tilhører inokulumet L004, ristekolbeforsøk 3.**

Tabellen viser vekt av veid begerglass før skilling av vannfase og olje fra ristekolber, vekt av veid begerglass med olje etter oljen ble skilt fra vannfasen, differansen som gir totalvolumet olje i gram og mg, Tilsats av DCM for å få en flytende løsning med kjent volum (mg/ml) og tilsats av DCM til 1 mg/ml olje per 1,5 ml. Formlene som er nevnt bak overskriftene er beregningene som er brukt. Disse er listet opp under kapittel F-3. Merk at negativ kontroll 3 ikke inneholdt olje og er derfor ikke tatt med i denne tabellen.

<b>ID</b>	<b>Vekt beerglass (g)</b>	<b>Vekt beerglass med olje (g)</b>	<b>Diff = Vekt olje (g)</b>	<b>Vekt olje (mg)</b>	<b>DMC tilsatt (ml)</b>	<b>Konsentrasjon oljeprøve (mg/ml) (formel 4)</b>	<b>Fortynning til 1 mg/ml i 1,5 ml (µl) (formel 5)</b>	<b>Tilsats av DCM (µl) til 1,5 ml (formel 6)</b>
<b>Negativ kontroll 1</b>	67,6	71,1	3,5	3500,0	50,0	70,0	21,4	1478,6
<b>Negativ kontroll 2</b>	57,3	61,8	4,5	4500,0	50,0	90,0	16,7	1483,3
<b>Negativ kontroll 3</b>	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Prøve 1</b>	87,3	91,5	4,2	4200,0	50,0	84,0	17,9	1482,1
<b>Prøve 2</b>	88,9	93,2	4,3	4300,0	50,0	86,0	17,4	1482,6
<b>Prøve 3</b>	68,4	72,5	4,1	4100,0	50,0	82,0	18,3	1481,7
<b>Prøve 4</b>	59,1	63,8	4,7	4700,0	50,0	94,0	16,0	1484,0

## Vedlegg I - DNeasy® Blood and Tissue kit

DNA-prøvene fra ristekolbeforsøk 1 ble isolert med DNeasy® Blood and Tissue kit, fremgangsmåten fra kittet er prosedyren som følger med kittet og er vist under:

### Protocol: Pretreatment for Gram-Positive Bacteria

This protocol is designed for purification of total DNA from Gram-positive bacteria, such as *Corynebacterium* spp. and *B. subtilis*. The protocol describes the preliminary harvesting of bacteria and incubation with lysozyme to lyse their cell walls before DNA purification.

#### Important points before starting

- See "Quantification of starting material", page 17, for details of how to collect and store samples, and how to determine the number of cells in a bacterial culture.
- Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see "Buffer AL", page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Gram-Positive Bacteria

#### Things to do before starting

- Prepare enzymatic lysis buffer as described in "Equipment and Reagents to Be Supplied by User", page 14.
- Preheat a heating block or water bath to 37°C for use in step 3.

#### Procedure

1. **Harvest cells (maximum 2 x 10<sup>9</sup> cells) in a microcentrifuge tube by centrifuging for 10 min at 5000 x g (7500 rpm). Discard supernatant.**
2. **Resuspend bacterial pellet in 180 µl enzymatic lysis buffer.**
3. **Incubate for at least 30 min at 37°C.**  
After incubation, heat the heating block or water bath to 56°C if it is to be used for the incubation in step 5.
4. **Add 25 µl proteinase K and 200 µl Buffer AL (without ethanol). Mix by vortexing.**  
**Note:** Do not add proteinase K directly to Buffer AL.  
Ensure that ethanol has not been added to Buffer AL (see "Buffer AL", page 18). Buffer AL can be purchased separately (see page 56 for ordering information).
5. **Incubate at 56°C for 30 min.**  
**Optional:** If required, incubate at 95°C for 15 min to inactivate pathogens. Note that incubation at 95°C can lead to some DNA degradation.
6. **Add 200 µl ethanol (96–100%) to the sample, and mix thoroughly by vortexing.**  
It is important that the sample and the ethanol are mixed thoroughly to yield a homogeneous solution.  
A white precipitate may form on addition of ethanol. It is essential to apply all of the precipitate to the DNeasy Mini spin column. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure.
7. **Continue with step 4 of the protocol "Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)", page 30.**

Gram-Positive Bacteria

4. Pipet the mixture from step 3 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.\*
5. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.\*
6. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500  $\mu\text{l}$  Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at  $20,000 \times g$  (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at  $20,000 \times g$  (14,000 rpm).

7. Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 200  $\mu\text{l}$  Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at  $\geq 6000 \times g$  (8000 rpm) to elute.

Elution with 100  $\mu\text{l}$  (instead of 200  $\mu\text{l}$ ) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield (see Figure 2, page 21).

8. **Recommended: For maximum DNA yield, repeat elution once as described in step 7.**

This step leads to increased overall DNA yield.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

**Note:** Do not elute more than 200  $\mu\text{l}$  into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

\* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

## Vedlegg J - Oppskrift DGGE - akrylamidløsninger

### J-1.

Til DGGE-gel ble det laget to akrylamidløsninger med 20 % og 70 % gradient. Innholdet i løsningene er oppført i tabell J-1-1.

#### **Tabell J-1-1: Oppskrift DGGE-gel.**

Tabellen viser kjemikalie tilsatt for å lage 20 % og 70 % akrylamidløsning for bakterier og archaea til støping av DGGE-gel.

<b>Kjemikalie</b>	<b>Bakterier (6 %)</b>		<b>Archaea (10 %)</b>	
	<b>20 %</b>	<b>70 %</b>	<b>20 %</b>	<b>70 %</b>
40 % Akrylamid/bis	15 ml	15 ml	25 ml	25 ml
50 x TAE-buffer	2 ml	2 ml	2 ml	2 ml
Formamid	8 ml	28 ml	8 ml	28 ml
Urea	8,4 g	29,4 g	8,4 g	29,4 g
dH <sub>2</sub> O	75 ml	75 ml	65 ml	45 ml
<b>Totalt</b>	<b>100 ml</b>	<b>100 ml</b>	<b>100 ml</b>	<b>100 ml</b>

Kjemikaliene brukt i akrylamidløsningene er vist i tabell J-1-1. Urea ble veid ut på vekt og tilsatt i flaske, dH<sub>2</sub>O og magnetrører ble deretter tilsatt. 40 % Akrylamid/bis, 50 x TAE-buffer og formamid ble tilsatt i avtrekkskap. Flaskene ble satt på magnetrører til alt var oppløst. 18 ml av hver løsning overføres til hvert sitt 50 ml rør, like før støping av gel ble det tilsatt 200 µl ammoniumpersulfid (10 % BIORAD) og 20 µl TEMED (N,N,N,N – tetrametyletyldiamin, BIORAD) til hvert rør. Dette ble blandet ved å vende rør opp/ned. Gradientapparatet ble stilt inn på 14,5 ml for 30 ml sprøyter. Ca. 15 ml ble trukket opp i hver sin sprøyte som ble satt på gradientapparatet. Kam ble satt på plass og gelene ble pakket godt inn i plast til neste dag.



## **K, L og M - Etterarbeid ristekolbeforsøk:**

Prosessering av resultatene er oppført i kapittel 4, resultater som er relevante for prøveopparbeiding er oppført her:

### **K-1 Ristekolbeforsøk 1**

Etterarbeid for ristekolbeforsøk 1 er vist i følgende kapittel:

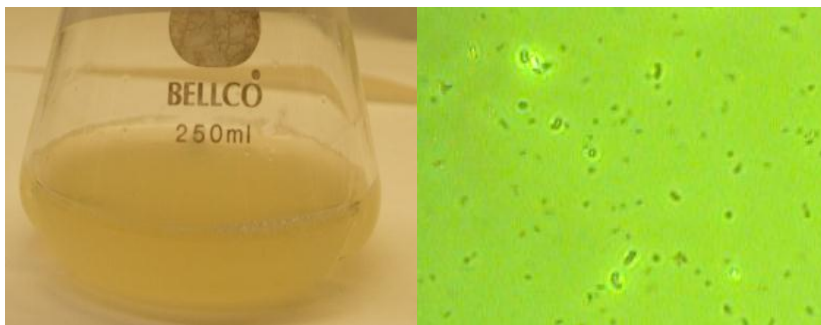
#### **K-1-1. Bilder og mikroskopibilder ristekolbeforsøk 1, inokulum ML**

Det ble tatt bilder av ristekolbene dag 1, 3 og 7 og vannfasen ble mikroskopert dag 7. Dag 7 med ristekolbene som inneholdt inokulum ML er vist i figur K-1 til K-6 og omtalt i kapittel 4, underkapittel 4.1.2, side 28.



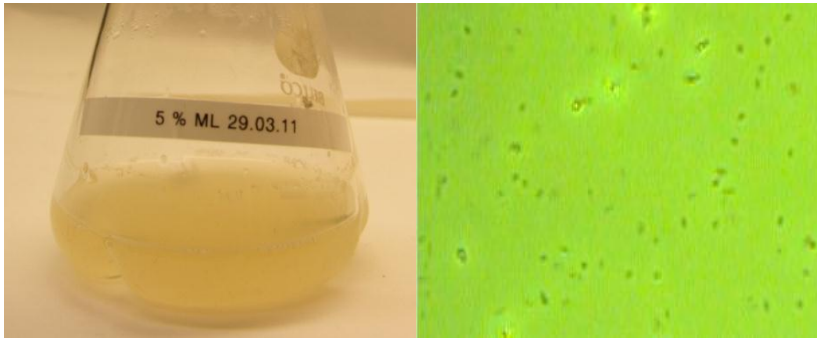
**Figur K-1: Negativ kontroll ML, dag 7- ristekolbeforsøk 1**

*Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE). Det er ingen blakking av vannfase og mikroskopibildet viser ingen oppvekst av mikroorganismer.*



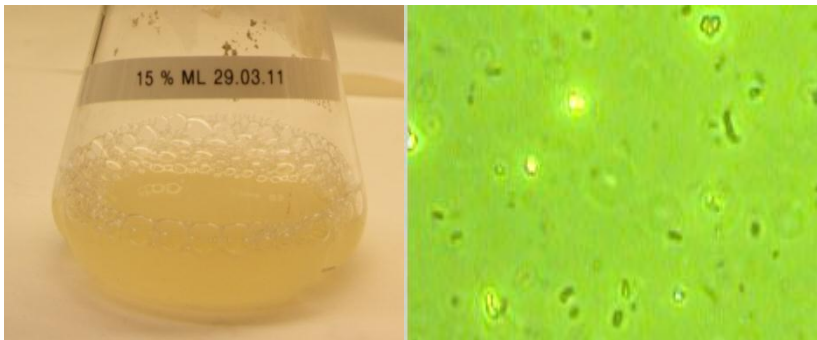
**Figur K-2: Prøve 1 ML, dag 7- ristekolbeforsøk 1**

*Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE) og inokulum. Det er blakking av vannfase og mikroskopibildet viser oppvekst av mikroorganismer.*



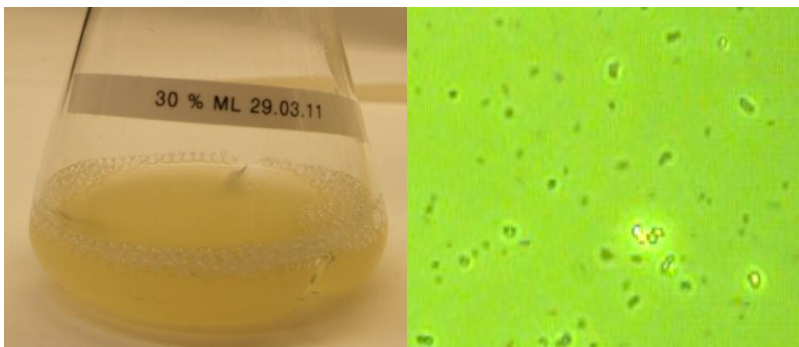
**FigurK-3: Prøve 2 ML, dag 7- ristekolbeforsøk 1**

*Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum og 5 % løsemiddel. Det er blakking av vannfase og mikroskopibildet viser oppvekst av mikroorganismer.*



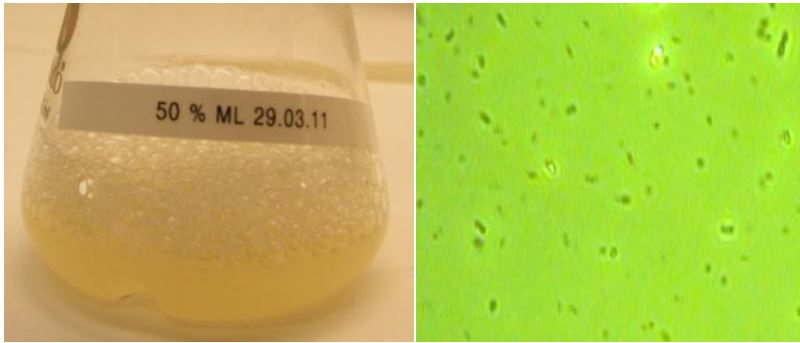
**Figur K-4: Prøve 3 ML, dag 7- ristekolbeforsøk 1**

*Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum og 15 % løsemiddel. Det er blakking av vannfase og mikroskopibildet viser oppvekst av mikroorganismer.*



**FigurK-5: Prøve 4 ML, dag 7- ristekolbeforsøk 1**

*Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum og 30 % løsemiddel. Det er blakking av vannfase og mikroskopibildet viser oppvekst av mikroorganismer.*



**FigurK-6: Prøve 5 ML, dag 7- ristekolbeforsøk 1**

*Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum og 50 % løsemiddel. Det er blakking av vannfase og mikroskopibildet viser oppvekst av mikroorganismer.*

**K-2. Måling av DNA-konsentrasjon, ristekolbeforsøk 1**

DNA ble ekstrahert fra vannfasen med DNeasy® Blood and Tissue kit i ristekolbeforsøk 1.

Konsentrasjonene og renheten til prøvene er vist i tabell K-2-1

**Tabell K-2-1: DNA-konsentrasjon ristekolbeforsøk 1**

Tabellen viser målt DNA-konsentrasjon i ristekolbene fra ristekolbeforsøk 1 rangert på dag prøvene er tatt. Konsentrasjon er oppgitt i ng/ul med A260/A280- og A260/A230 ratio som viser renhet av DNA. A260/A280 ratio er optimal rundt 1,8 A260/A280 og A260/A230 ratio er optimal mellom 2,0 og 2,2 A260/A230. Prøvene som har optimal A260/A280 er merket med grønn skrift og optimal A260/A230 ratio er merket med rød skrift.

Inokulum	Prøve ID	Dag	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230
	Blank		0,200	0,004	0,013	0,320	0,420
L004	Negativ kontroll	1	5,190	0,104	0,268	0,390	-0,390
L004	Negativ kontroll	3	3,420	0,068	0,041	1,680	0,150
L004	Prøve 1	3	11,200	0,224	0,136	1,650	0,560
L004	Prøve 1	3	11,070	0,221	0,107	2,070	0,530
L004	Prøve 2	3	7,320	0,146	0,304	0,480	-0,840
L004	Prøve 3	3	6,440	0,129	0,172	0,750	-3,900
L004	Prøve 4	3	9,970	0,199	0,110	1,810	0,500
	Blank		0,930	0,019	0,036	0,520	1,700
L004	Negativ kontroll	7	3,600	0,072	0,045	1,600	0,230
L004	Prøve 1	7	14,380	0,288	0,176	1,640	0,520
L004	Prøve 2	7	6,450	0,129	0,268	0,480	-0,810
L004	Prøve 3	7	7,450	0,149	0,098	1,510	0,270
L004	Prøve 4	7	8,630	0,173	0,070	2,470	0,430
L004	Prøve 4	7	8,360	0,167	0,089	1,880	0,470

**Tabell**

*fortsetter*

**Tabell****fortsetter**

<b>Inokulum</b>	<b>Prøve ID</b>	<b>Dag</b>	<b>ng/ul</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
ML	Prøve 1	1	22,240	0,445	0,315	1,410	2,070
	Blank		-0,030	-0,001	-0,009	0,080	-0,390
ML	Negativ kontroll	3	0,790	0,016	0,013	1,190	0,060
ML	Prøve 1	3	84,640	1,693	0,857	1,980	1,500
ML	Prøve 1	3	38,260	0,765	0,381	2,010	1,130
ML	Prøve 2	3	56,780	1,136	0,585	1,940	1,290
ML	Prøve 3	3	85,500	1,710	0,997	1,720	0,890
ML	Prøve 4	3	48,390	0,968	0,505	1,910	1,030
ML	Negativ kontroll	7	-5,890	-0,118	0,256	-0,460	0,150
ML	Prøve 1	7	52,570	1,051	0,801	1,310	5,130
ML	Prøve 1	7	49,640	0,993	0,507	1,960	1,040
ML	Prøve 2	7	59,990	1,200	0,585	2,050	1,250
ML	Prøve 3	7	42,800	0,856	0,434	1,970	1,110
ML	Prøve 4	7	42,270	0,845	0,440	1,920	1,100
	Negativ kontroll reagens		3,120	0,062	0,051	1,220	0,150

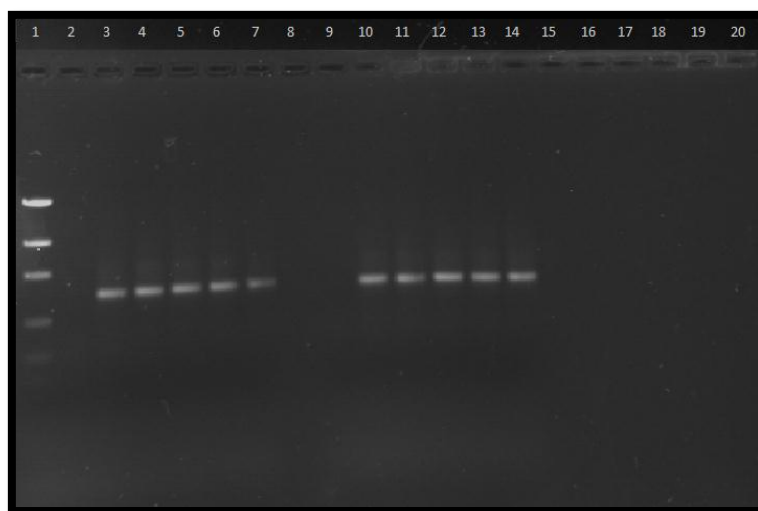
### K-3 Analyse av 16S rRNA PCR-produkt for produksjekk av bakterie på agarosegel, ristekolbeforsøk 1

PCR med 16S rRNA primere 341 f Bac og 907 r Bac for bakterier ble kjørt på en agarosegel for å sjekke om DNA-isoleringen ble vellykket. Det ble funnet produkt i ristekolbene som var tilsatt inokulum Ettersom disse gelene kun er et trinn for å sjekke produkt vil de ikke bli tatt med i resultatvurdering, men resultatene fra inokulum ML er vist i figur K-3 med tilhørende prøve ID vist i tabell K-3-1.

#### Tabell K-3: Brønnoppsett agarosegel 1, ristekolbeforsøk 1.

Prøvene er sortert på inokulum L004 og ML og kronologisk for prøvetakningsdag. Prøver merket med firkant (#) er ikke tilsatt inokulum.

Brønn	Prøve	Dag	Brønn	Prøve	Dag
1	Ladder		9	ML Negativ kontroll #	7
2	ML Prøve 1 #	1	10	ML Prøve 1 (0 % løsemiddel)	7
3	ML Negativ kontroll #	3	11	ML Prøve 2 (5 % løsemiddel)	7
4	ML Prøve 1 (0 % løsemiddel)	3	12	ML Prøve 3 (15 % løsemiddel)	7
5	ML Prøve 2 (5 % løsemiddel)	3	13	ML Prøve 4 (30 % løsemiddel)	7
6	ML Prøve 3 (15 % løsemiddel)	3	14	ML Prøve 5 (50 % løsemiddel)	7
8	ML Prøve 5 (50 % løsemiddel)	3	15	Reagens kontroll	



**Figur K-3-1: Agarosegel 1, forsøk 1.** PCR utført med 16S rRNA Primere: 341 f Bac /907 r Bac.

DNA ladder er vist til venstre med 2000 basepar som høyeste markør og 100 basepar som laveste markør. DNA prøvene er oppført i tabell K-3

PCR resultatene viser at det er dannet produkt fra alle prøvene som er tilsatt inokulum. Dag 1 ble det kun tatt prøve av prøve 1, men den antas å være negativ da dag 3 og 7 ikke visert PCR produkt.

## L. Ristekolbeforsøk 2

Etterarbeid for ristekolbeforsøk 2 er vist i følgende kapittel:

### L-1. OD-verdier ristekolbeforsøk 2:

OD-verdier i dette ristekolbeforsøket fra originalplater er vist i tabell L-1-1 (L004) og tabell L-1-2 (ML).

#### Tabell L-1-1: Originalplate L004,

Absorbans er vist som OD ved 660 nm, OD>0,05 indikerer tilstrekkelig vekst av mikroorganismer.

Tall merket med rødt indikerer tilstrekkelig vekst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,029	0,030	0,027	0,027	0,029	0,029	0,028	0,030	0,032	0,029	0,094	0,516
B	0,119	0,090	0,378	0,674	0,679	0,057	0,542	0,376	0,706	0,103	0,124	0,190
C	0,073	0,400	0,572	0,605	0,066	0,270	0,037	0,070	0,946	0,289	0,286	0,863
D	0,371	0,420	0,557	0,442	0,882	0,547	0,387	0,203	0,042	0,428	0,217	0,661
E	0,180	0,560	0,468	0,557	0,836	0,478	0,565	0,657	0,268	0,453	0,055	0,126
F	0,047	0,380	0,698	0,537	0,394	0,613	0,262	0,597	0,536	0,304	0,172	0,416
G	0,040	0,450	0,489	0,415	0,643	0,412	0,592	0,047	0,257	0,269	0,435	0,571
H	0,029	0,030	0,030	0,028	0,033	0,028	0,028	0,049	0,027	0,027	0,891	0,601

#### Tabell L-1-2: Originalplate ML,

Absorbans er vist som OD ved 660 nm, OD>0,05 indikerer vekst. Tall merket med rødt indikerer tilstrekkelig vekst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,029	0,032	1,116	0,636	0,996	1,076	1,015	1,092	1,069	1,109	0,446	0,462
B	0,033	1,122	1,186	0,387	1,058	0,521	0,113	1,360	0,759	0,613	0,647	1,779
C	0,030	0,033	0,559	0,789	1,060	1,077	1,067	1,983	0,570	1,189	0,583	0,497
D	0,031	0,031	0,184	0,817	1,017	1,083	0,421	1,095	0,517	0,519	0,571	0,534
E	0,028	1,136	1,127	0,857	1,069	0,436	1,018	0,460	1,951	0,729	0,555	0,488
F	0,894	0,035	1,151	1,314	1,090	0,503	1,560	1,970	1,140	0,610	0,499	0,479
G	1,170	1,136	1,043	1,101	1,105	2,015	1,848	1,057	2,004	0,530	0,607	0,490
H	1,457	1,090	1,150	1,156	1,194	0,621	0,419	1,641	0,528	0,549	0,522	1,106

OD<sub>660nm</sub> ble målt på den reinokulerte platen vist i tabell L-1-3 (L004) og tabell L-1-4 (ML) og sammenlignet med OD-verdier fra originalplaten tabell L-1-1 (L004) og tabell L-1-2 (ML).

**Tabell L-1-3: Brønnplate etter oppdyrking fra originalplate L004,**

Absorbans er vist som OD ved 660 nm, OD>0,05 indikerer vekst. Tall merket med rødt indikerer tilstrekkelig vekst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,779	0,737	0,023	0,023	0,025	0,026	0,023	0,022	0,024	0,024	0,024	0,023
B	0,865	0,709	0,028	0,024	0,027	0,791	0,795	0,695	0,715	0,909	0,746	0,025
C	0,363	0,034	0,344	0,031	0,676	0,535	0,142	0,036	0,714	0,690	0,344	0,817
D	0,027	0,025	0,728	0,385	0,673	0,676	0,824	0,634	0,661	0,665	0,962	0,258
E	0,450	0,033	0,728	0,025	0,193	0,606	0,257	0,643	0,676	0,688	0,401	0,763
F	0,703	0,593	0,308	0,538	0,026	0,025	0,226	0,025	0,946	0,694	0,772	0,026
G	0,025	0,026	0,025	0,497	1,638	0,801	0,026	0,718	1,591	0,503	0,023	0,025
H	0,945	0,026	0,025	0,024	0,025	0,023	0,027	0,024	0,024	0,024	0,028	0,024

**Tabell L-1-4 Brønnplate etter oppdyrking fra originalplate L004,**

Absorbans er vist som OD ved 660 nm, OD>0,05 indikerer vekst. Tall merket med rødt indikerer tilstrekkelig vekst.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,029	0,030	1,662	1,775	2,156	1,936	1,920	1,943	1,914	1,878	0,264	0,170
B	0,030	1,820	1,943	1,581	1,901	0,134	0,027	1,798	1,505	1,078	0,042	2,350
C	0,029	0,398	1,729	1,527	1,621	1,615	1,890	2,499	0,237	1,841	0,214	0,075
D	0,030	0,030	1,447	1,393	1,675	1,867	0,230	1,827	0,274	0,424	0,285	0,286
E	0,030	1,773	1,938	1,661	1,936	0,279	1,676	0,219	2,567	0,030	0,262	0,111
F	1,639	0,029	1,875	2,345	1,892	0,232	1,610	2,507	1,855	0,168	0,215	0,449
G	1,733	1,535	1,852	1,903	1,915	2,074	2,420	1,748	2,234	0,058	0,162	0,258
H	2,065	1,510	1,967	1,882	2,057	1,701	0,230	2,353	0,150	0,135	1,005	1,916

Inokulum ble fortynnet til OD<sub>660nm</sub> =1/ml ved beregning med formel 2 som beskrevet i vedlegg D, kapittel D-3 side 91 .

OD-verdier for det endelige inokulumet som ble tilsatt var 1,12 OD/ml for L004 og 1,13 OD/ml for ML.



## L-2 Bilder og mikroskopi, ristekolbeforsøk 2

Det ble tatt bilder av ristekolbene og vannfasen ble mikroskopert dag 7.

### L-2-1. Inokulum ML

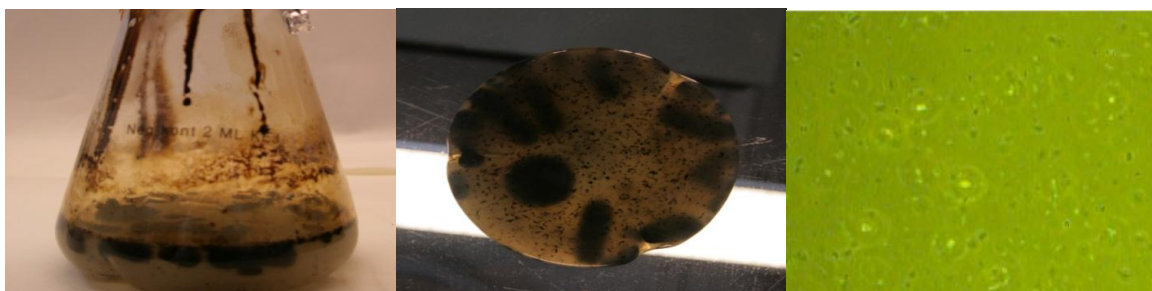
Bilder av ristekolbene til prøveserien med inokulum ML. Bilder og mikroskopibilder tatt dag 7 med prøveserien som inneholdt inokulum ML er vist i figur L-1 til L-4 og omtalt i kapittel 4.2.3, side 39



**FigurL-1: Negativ kontroll ML, dag 7.**

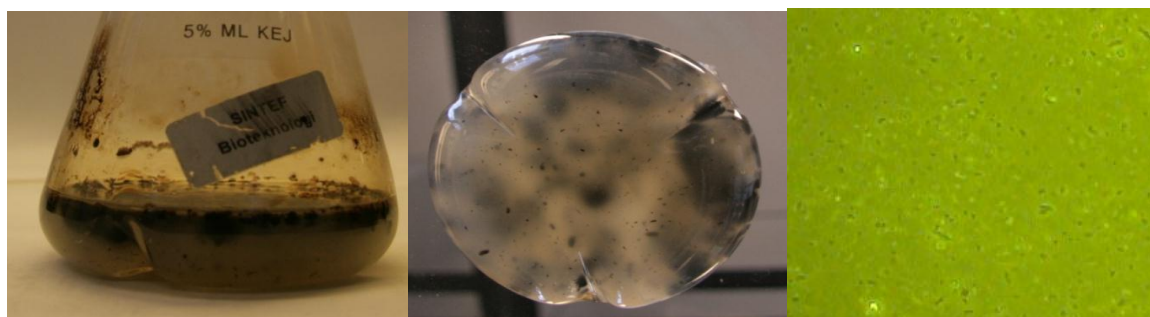
Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE) og olje. Oljen ligger som et flak på vannfasen.

Mikroskopibildet er vanskelig å differensiere men de gule sirklene som vises på bildet er oljepartikler som lyser opp.

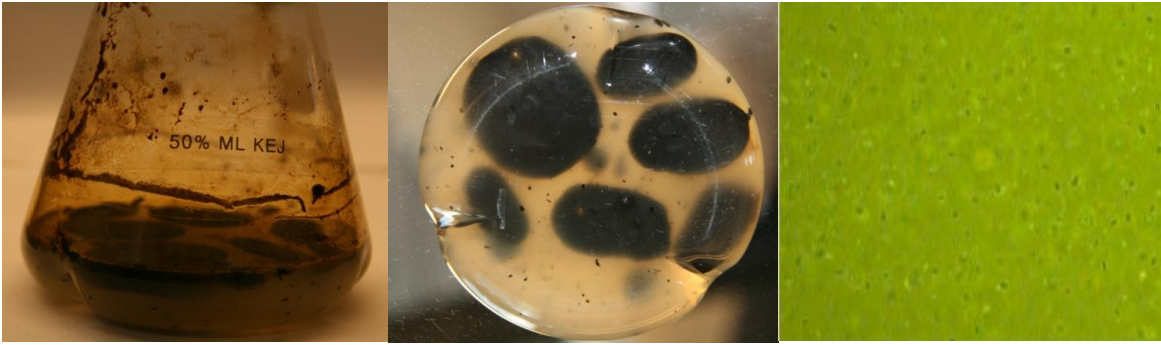


**FigurL-2: Prøve 1 ML, 0 % løsemiddel, dag 7.**

Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum og olje. Oljen har samlet seg som klumper i vannfasen. Mikroskopibildet viser at mikroorganismene har hatt oppvekst eller oljefragmenter som er vasket ut i oljefasen



**Figur L-3: Prøve 2 ML, 5 % løsemiddel, dag 7 -** Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum, 5 % løsemiddel og olje. Oljen har samlet seg som klumper i vannfasen. Mikroskopibildet viser oppvekst av mikroorganismer eller oljefragmenter som er vasket ut i oljefasen.

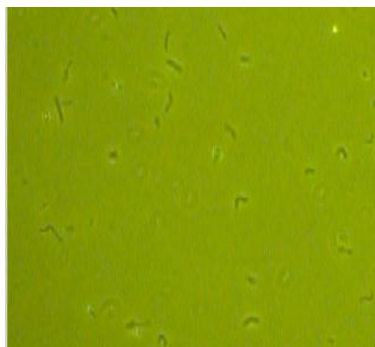


**Figur L-4: Prøve 5 ML, 50 % løsemiddel, dag 7 -**

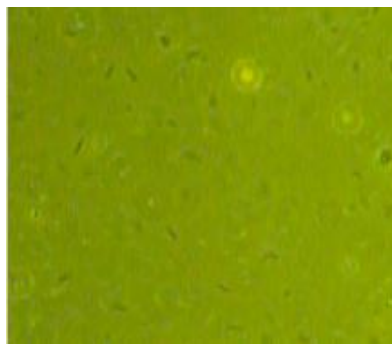
*Kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum, 50 % løsemiddel og olje. Oljen har samlet seg som store klumper i vannfasen. Mikroskopibildet viser oppvekst av mikroorganismer eller oljefragmenter som er vasket ut fra oljefasen.*

### L-3. Mikroskopibilder, inokulum L004, ristekolbeforsøk 2

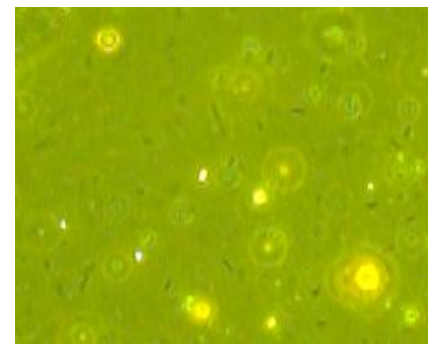
Vannfasen ble mikroskopert dag 7 og ristekolbene som inneholdt inokulum ML er vist i figur L-5 til L-10 og omtalt i kapittel 4, underkapittel 4.2.3, side 39.



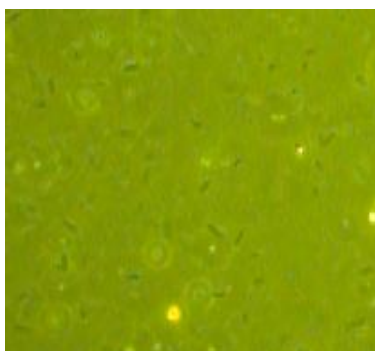
**Figur L-5:**  
**Mikroskopi, negativ kontroll, L004, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE) og olje. Bildet viser oppvekst av mikroorganismer eller oljefraksjoner i vannfasen.



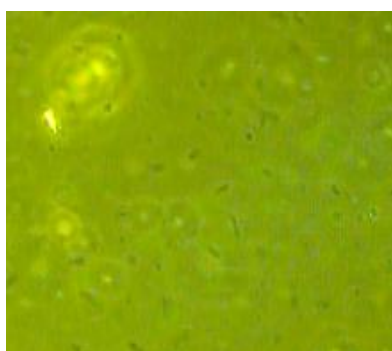
**Figur L-6:**  
**Mikroskopi, Prøve 1, L004, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum og olje. Bildet viser oppvekst av mikroorganismer eller oljefraksjoner i vannfasen.



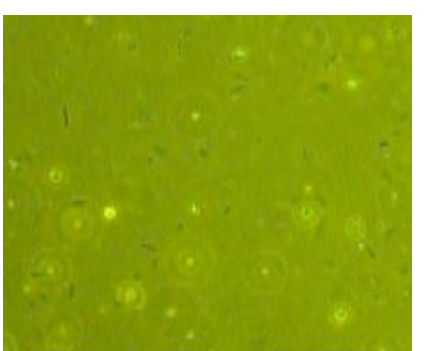
**Figur L-7:**  
**Mikroskopi, Prøve 2, L004, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum, 5 % løsemiddel og olje. Bildet viser oppvekst av mikroorganismer eller oljefraksjoner i vannfasen.



**Figur L-8:**  
**Mikroskopi, Prøve 3, L004, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum 15 % løsemiddel og olje. Bildet viser oppvekst av mikroorganismer eller oljefraksjoner i vannfasen.



**Figur L-9:**  
**Mikroskopi, Prøve 4, L004, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum, 30 % løsemiddel og olje. Bildet viser oppvekst av mikroorganismer eller oljefraksjoner i vannfasen.



**Figur L-10:**  
**Mikroskopi, Prøve 5, L004, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium (MMAcYE), inokulum, 50 % løsemiddel og olje. Bildet viser oppvekst av mikroorganismer eller oljefraksjoner i vannfasen.

**L-4. Måling av DNA-konsentrasjon ristekolbeforsøk 2:**

DNA ble ekstrahert fra vannfasen med FastDNA SPIN kit for Soil. Konsentrasjonene og renheten til prøvene er vist i tabell K-1.

**Tabell L-1: DNA-konsentrasjon ristekolbeforsøk 2**

Tabellen viser målt DNA-konsentrasjon i ristekolbene fra ristekolbeforsøk 1 rangert på dag prøvene er tatt. Konsentrasjon er oppgitt i ng/ul med A260/A280- og A260/A230 ratio som viser renhet av DNA. A260/A280 ratio er optimal rundt 1,8 A260/A280 og A260/A230 ratio er optimal mellom 1,8 og 2,2 A260/A230. Prøvene som har optimal A260/A280 er merket med grønn skrift og optimal A260/A230 ratio er merket med rød skrift.

<b>Inokulum</b>	<b>Prøve ID</b>	<b>Dag</b>	<b>ng/ul</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
	Blank		-0,040	-0,001	0,000	-3,300	0,080
L004	Negativ kontroll 1	1	5,020	0,100	0,069	1,450	0,010
L004	Prøve 1	1	3,360	0,067	0,050	1,340	0,010
L004	Prøve 2	1	4,830	0,097	0,032	3,060	0,010
L004	Prøve 3	1	4,590	0,092	0,043	2,150	0,010
L004	Prøve 4	1	5,850	0,117	0,064	1,830	0,010
L004	Prøve 5	1	5,600	0,112	0,082	1,360	0,010
	Blank		0,260	0,005	0,013	0,400	0,160
L004	Negativ kontroll	3	4,190	0,084	0,067	1,260	0,010
L004	Prøve 1	3	19,420	0,388	0,529	0,730	0,060
L004	Prøve 2	3	10,430	0,209	0,119	1,760	0,030
L004	Prøve 3	3	10,460	0,209	0,113	1,860	0,020
L004	Prøve 4	3	9,490	0,190	0,108	1,750	0,020
L004	Prøve 5	3	13,070	0,261	0,139	1,880	0,020
	Blank		0,540	0,011	-0,002	-6,030	0,860
L004	Negativ kontroll	7	3,530	0,071	0,062	1,140	0,010
L004	Prøve 1	7	6,730	0,135	0,070	1,920	0,010
L004	Prøve 2	7	8,230	0,165	0,103	1,610	0,010
L004	Prøve 3	7	11,160	0,223	0,196	1,140	0,030
L004	Prøve 4	7	7,980	0,160	0,089	1,800	0,030

*Tabell fortsetter**Tabell fortsetter*

<i>Inokulum</i>	<i>Prøve ID</i>	<i>Dag</i>	<i>ng/ul</i>	<i>A260</i>	<i>A280</i>	<i>260/280</i>	<i>260/230</i>
	Blank		0,420	0,008	0,019	0,440	1,810
ML	Negativ kontroll	1	3,520	0,070	0,060	1,180	0,010
ML	Prøve 1	1	3,550	0,071	0,022	3,220	0,010
ML	Prøve 2	1	4,670	0,093	0,053	1,750	0,010
ML	Prøve 3	1	5,900	0,118	0,068	1,740	0,010
ML	Prøve 4	1	5,080	0,102	0,060	1,690	0,010
ML	Prøve 5	1	5,860	0,117	0,060	1,940	0,010
	Blank		0,070	0,001	0,068	0,020	1,150
ML	Negativ kontroll	3	4,670	0,093	0,052	1,800	0,010
ML	Prøve 1	3	48,260	0,965	0,517	1,870	0,100
ML	Prøve 2	3	43,320	0,866	0,458	1,890	0,060
ML	Prøve 3	3	38,640	0,773	0,366	2,110	0,070
ML	Prøve 4	3	38,190	0,764	0,438	1,740	0,060
ML	Prøve 5	3	43,430	0,869	0,478	1,820	0,080
	Blank		-0,220	-0,004	-0,003	1,510	-0,180
ML	Negativ kontroll	7	11,800	0,236	0,138	1,710	0,040
ML	Prøve 1	7	46,620	0,932	0,483	1,930	0,090
ML	Prøve 2	7	31,030	0,621	0,328	1,890	0,060
ML	Prøve 3	7	27,020	0,540	0,289	1,870	0,060
ML	Prøve 4	7	25,900	0,518	0,283	1,830	0,040
ML	Prøve 5	7	27,440	0,549	0,297	1,850	0,060
	Negativ kontroll reagens		4,550	0,091	0,057	1,590	0,010

## **Vedlegg M - Ristekolbeforsøk 3**

Etterarbeid for ristekolbeforsøk 3 er vist i følgende kapittel:

### **M-1. OD-verdier ristekolbeforsøk 3:**

OD-verdier i dette ristekolbeforsøket er fra inokula av glyserolnedfryst inokula fra ristekolbeforsøk 2. Glyserolampullene ble tint og dyrket i mineralmedium RMMAcYE. 200  $\mu$ l fra oppdyrkingen ble målt på spektrofotometer:

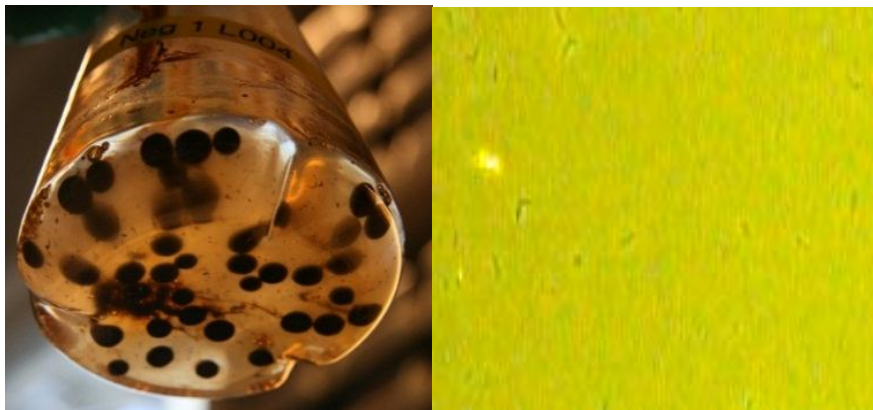
- L004 ble målt til 0,995 OD<sub>660nm</sub>

- ML ble målt til 3,06 OD<sub>660nm</sub>

L004 hadde riktig OD og trengte ikke fortykning, ML ble fortennet etter formel 2 og OD ble målt igjen og viste 1,01 OD<sub>660nm</sub>

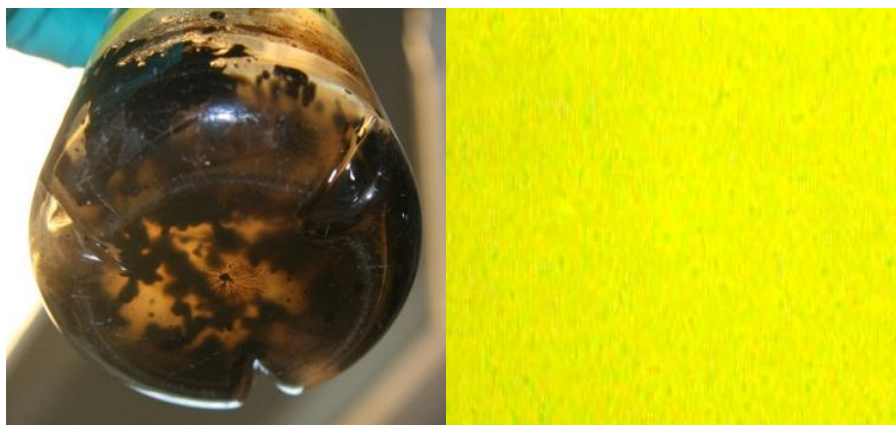
**M-2. Bilder og mikroskopibilder, inokulum L004, ristekolbeforsøk 3**

Det ble tatt bilder av ristekolbene dag 1, 3 og 7 og vannfasen ble mikroskopert dag 7. Dag 7 med ristekolbene som inneholdt inokulum L004 er vist i figur M-1 til M-7 og omtalt i kapittel 4.3.3, side 53.



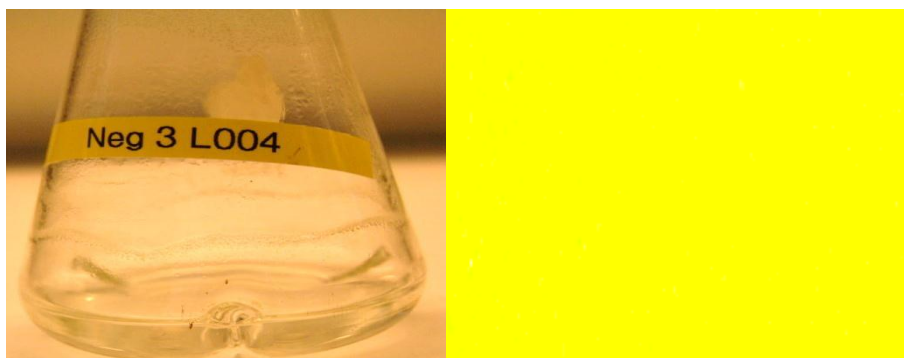
**Figur M-1: Negativ kontroll 1, L004, dag 7 - ristekolbeforsøk 3**

*Kolben er tilsatt mineralmedium (MMAcYE) og olje. Oljen har klumpet seg sammen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer eller oljefragmenter i vannfasen.*

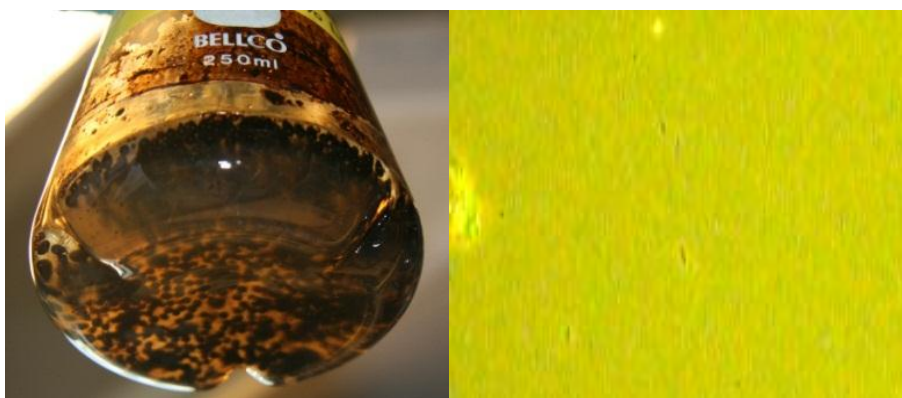


**Figur M-2: Negativ kontroll 2, L004, dag 7 - ristekolbeforsøk 3**

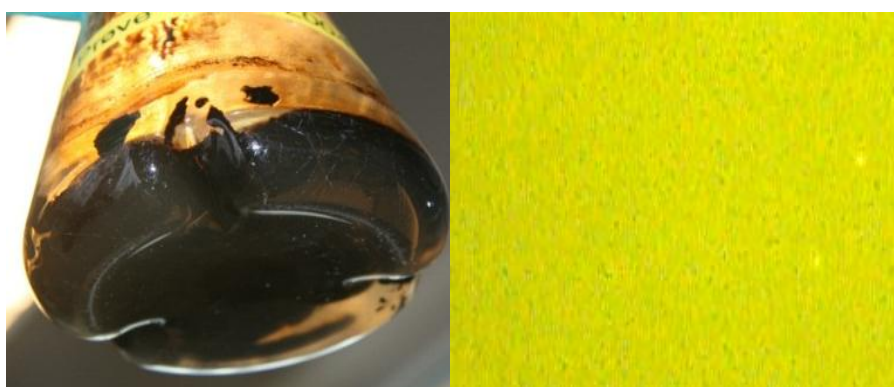
*Kolben er tilsatt mineralmedium (MMAcYE) og olje. Oljen har fordelt seg i vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer eller oljefragmenter i vannfasen.*



**Figur M-3: Negativ kontroll, L004, dag 7 - ristekolbeforsøk 3**  
Kolben inneholder kun mineralmedium (MMAcYE). Det er ingen blakking i vannfasen og mikroskopibildet viser ingen tegn til vekst av mikroorganismer.

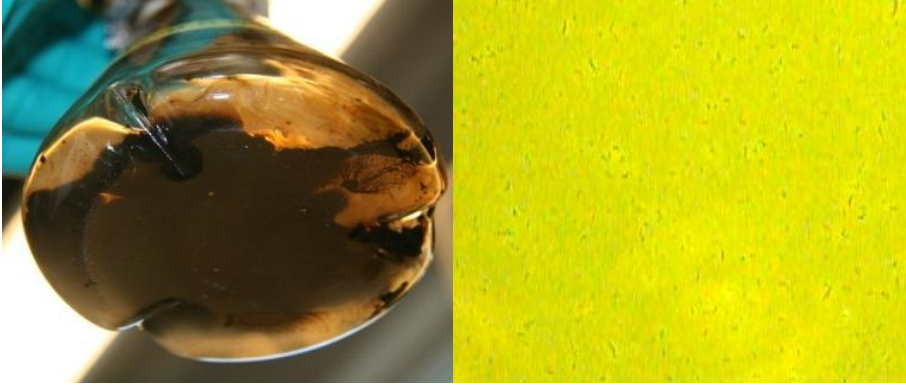


**Figur M-4: Prøve 1, L004, dag 7 - ristekolbeforsøk 3**  
Kolben er tilsatt mineralmedium (MMAcYE), 5 % løsemiddel og olje. Oljen har fordelt seg i vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer eller oljefragmenter i vannfasen.



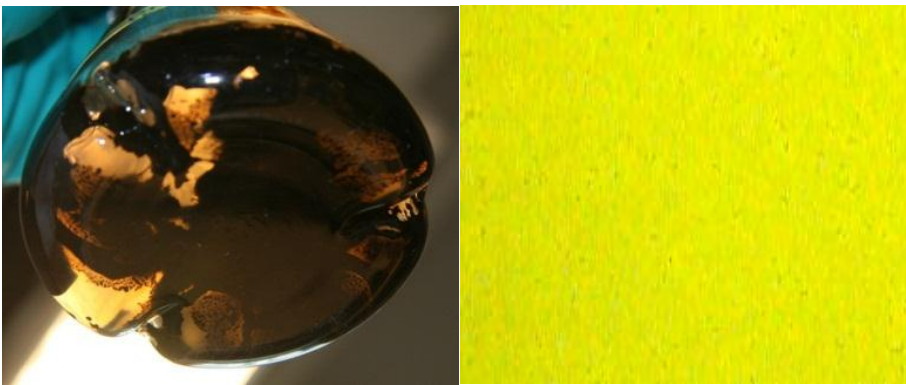
**Figur M-5: Prøve 2, L004, dag 7 - ristekolbeforsøk 3**  
Kolben er tilsatt mineralmedium (MMAcYE), 50 % løsemiddel og olje. Oljen ligger som et flak på vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer eller oljefragmenter i vannfasen.





**Figur M-6: Prøve, L004, dag 7 - ristekolbeforsøk 3**

*Kolben er tilsatt mineralmedium (MMAcYE), inokulum, 5 % løsemiddel og olje. Oljen har fordelt seg i vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer eller oljefragmenter i vannfasen.*



**Figur M-7: Prøve, L004, dag 7 - ristekolbeforsøk 3**

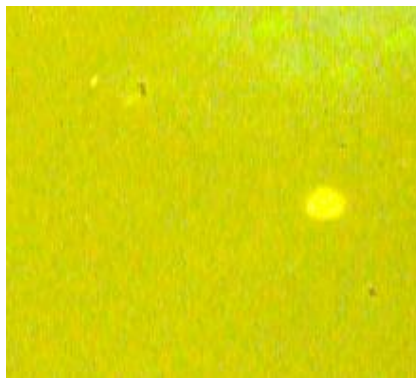
*Kolben er tilsatt mineralmedium (MMAcYE), inokulum, 50 % løsemiddel og olje. Oljen har fordelt seg noe i vannfasen og mikroskopibildet viser tegn til oppvekst av mikroorganismer eller oljefragmenter i vannfasen.*

### **M-3 Mikroskopibilder, inokulum ML, ristekolbeforsøk 3**

Vannfasen ble mikroskopert dag 7 og ristekolbene som inneholdt inokulum ML er vist i figur M-8 til M-14 og omtalt i kapittel 5, underkapittel 5.3.3, side 48.



**Figur M-8: Mikroskopi, Negativ kontroll 1 ML, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium og olje.  
Mikroskopibildet viser mikroorganismer eller små oljefragmenter vasket ut i vannfasen



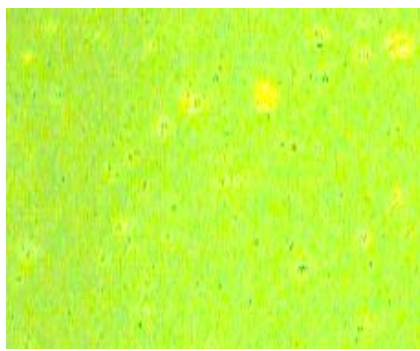
**Figur M-9: Mikroskopi, Negativ kontroll 2 ML, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium og olje.  
Mikroskopibildet viser mikroorganismer eller små oljefragmenter vasket ut i vannfasen



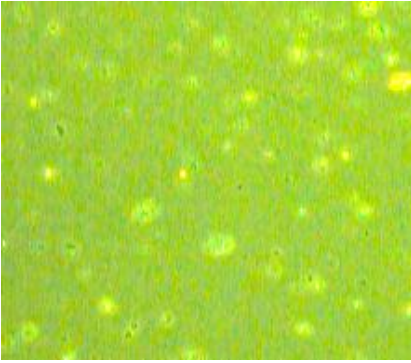
**Figur M-10: Mikroskopi, Negativ kontroll 3 ML, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder kun mineralmedium  
Mikroskopibildet viser ingen tegn til mikroorganismer eller små oljefragmenter vasket ut i vannfasen



**Figur M-11: Mikroskopi, Prøve 1 ML, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium, 5 % løsemiddel og olje. Mikroskopibildet viser mikroorganismer eller små oljefragmenter vasket ut i vannfasen

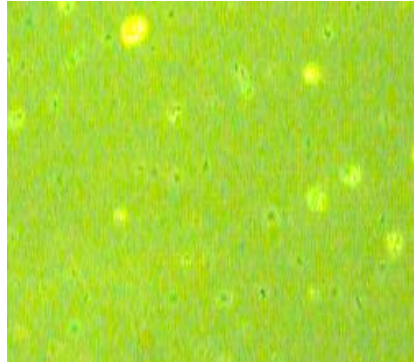


**Figur M-12: Mikroskopi, Prøve 2 ML, dag 7 -**  
Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium, 50 % løsemiddel og olje. Mikroskopibildet viser mikroorganismer eller små oljefragmenter vasket ut i vannfasen



**Figur M-13: Mikroskopi, Prøve 3 ML, dag 7 -**

Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium, 5 % løsemiddel, inokulum og olje. Mikroskopibildet viser mikroorganismer eller små oljefragmenter vasket ut i vannfasen



**Figur M-14: Mikroskopi, Prøve 4 ML, dag 7 -**

Vannfasen fra kolben inneholder mineralmedium, 50 % løsemiddel, inokulum og olje. Mikroskopibildet viser mikroorganismer eller små oljefragmenter vasket ut i vannfasen

**M-4. Måling av DNA-konsentrasjon, ristekolbeforsøk 3**

DNA ble ekstrahert fra vannfasen med FastDNA SPIN kit for Soil. Konsentrasjonene og renheten til prøvene er vist i tabell M-4-1

**Tabell M-4-1: DNA-konsentrasjon ristekolbeforsøk 3**

Tabellen viser målt DNA-konsentrasjon i ristekolbene fra ristekolbeforsøk 1 rangert på dag prøvene er tatt. Konsentrasjon er oppgitt i ng/ul med A260/A280- og A260/A230 ratio som viser renhet av DNA. A260/A280 ratio er optimal rundt 1,8 A260/A280 og A260/A230 ratio er optimal mellom 1,8 og 2,2 A260/A230. Prøvene som har optimal A260/A280 er merket med grønn skrift og optimal A260/A230 ratio er merket med rød skrift.

<b>Inokulum</b>	<b>Prøve ID</b>	<b>Dag</b>	<b>ng/ul</b>	<b>A260</b>	<b>A280</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
L004	Negativ kontroll 1	1	11,660	0,233	0,076	3,050	0,350
L004	Negativ kontroll 2	1	4,710	0,094	0,022	4,240	0,190
L004	Negativ kontroll 3	1	12,740	0,255	0,178	1,430	0,420
L004	Prøve 1	1	3,780	0,076	0,043	1,760	0,190
L004	Prøve 2	1	7,420	0,148	0,072	2,060	0,280
L004	Prøve 3	1	4,860	0,097	0,043	2,270	0,160
L004	Prøve 4	1	4,480	0,090	0,011	8,290	0,220
L004	Negativ kontroll 1	3	3,280	0,066	0,053	1,250	0,130
L004	Negativ kontroll 2	3	3,200	0,064	0,041	1,560	0,120
L004	Negativ kontroll 3	3	4,060	0,081	0,071	1,140	0,250
L004	Prøve 1	3	6,950	0,139	0,040	3,480	0,330
L004	Prøve 2	3	4,390	0,088	-0,009	-9,490	0,190
L004	Prøve 3	3	10,020	0,200	0,073	2,740	0,400
L004	Prøve 4	3	4,390	0,088	0,065	1,350	0,360
L004	Negativ kontroll 1	7	1,810	0,036	0,010	3,510	0,070
L004	Negativ kontroll 2	7	3,560	0,071	0,052	1,360	0,120
L004	Negativ kontroll 3	7	2,160	0,043	0,014	3,100	0,080
L004	Prøve 1	7	13,390	0,268	0,105	2,550	0,460
L004	Prøve 2	7	34,940	0,699	0,377	1,850	0,900
L004	Prøve 3	7	46,710	0,934	0,533	1,750	1,260
L004	Prøve 4	7	49,000	0,980	0,560	1,750	0,900
	Negativ kontroll reagens		2,780	0,056	0,071	0,790	0,450
	BLANK		1,920	0,038	0,033	1,170	0,270
<b>Tabell fortsetter</b>							

<i>Tabell fortsetter</i>							
<i>Inokulum</i>	<i>Prøve ID</i>	<i>Dag</i>	<i>ng/ul</i>	<i>A260</i>	<i>A280</i>	<i>260/280</i>	<i>260/230</i>
	Blank		-0,510	-0,010	-0,024	0,410	-0,980
	Blank		0,030	0,001	0,029	0,020	0,030
ML	Negativ kontroll 1	1	5,410	0,108	0,100	1,080	0,250
ML	Negativ kontroll 2	1	4,420	0,088	0,043	2,070	0,210
ML	Prøve 1	1	6,970	0,139	0,111	1,260	0,330
ML	Prøve 2	1	5,610	0,112	0,082	1,370	0,180
ML	Prøve 3	1	7,750	0,155	0,096	1,620	0,310
ML	Prøve 4	1	5,040	0,101	0,050	2,000	0,200
ML	Negativ kontroll 1	3	5,260	0,105	0,075	1,410	0,350
ML	Negativ kontroll 2	3	37,780	0,756	0,376	2,010	1,170
ML	Prøve 1	3	24,370	0,487	0,291	1,680	2,140
ML	Prøve 2	3	12,100	0,242	0,141	1,710	0,430
ML	Prøve 3	3	31,300	0,626	0,351	1,780	0,650
ML	Prøve 4	3	27,580	0,552	0,323	1,710	0,670
ML	Negativ kontroll 1	7	7,010	0,140	0,083	1,680	0,270
ML	Negativ kontroll 2	7	5,970	0,119	0,072	1,670	0,230
ML	Prøve 1	7	10,620	0,212	0,118	1,800	0,440
ML	Prøve 2	7	10,790	0,216	0,113	1,910	0,560
ML	Prøve 3	7	15,370	0,307	0,115	2,670	0,560
ML	Prøve 4	7	12,860	0,257	0,144	1,790	0,420
	Blank		-1,220	-0,024	-0,024	1,010	0,330