

Astrid Lillebjerka

**NTNU**  
Norges teknisk-naturvitenskapelige  
universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

Astrid Lillebjerka

## Biokonservering - Screening av melkesyrebakterier for inhibering av patogene bakterier i sjømat

Mai 2019





Kunnskap for en bedre verden

# Biokonservering - Screening av melkesyrebakterier for inhibering av patogene bakterier i sjømat

**Astrid Lillebjerka**

Mat og teknologi

Innlevert: Mai 2019

Hovedveileder: Anita Nordeng Jakobsen

Medveileder: Sunniva Hoel

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

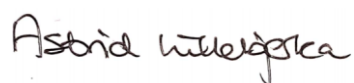


## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved institutt for bioteknologi og matvitenskap, fakultet for naturvitenskap ved Norges Teknisk-Naturvitenskapelige universitet (Trondheim). Arbeidet ble utført høsten 2018 og våren 2019, og utgjør 45 studiepoeng.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere Anita Nordeng Jakobsen og Sunniva Hoel for god veiledning både til det praktiske arbeidet og under skriveprosessen. Jeg ønsker også å takke stipendiat Jelena Stupar som har hjulpet meg under laboratoriearbeidet, medstudent Maja Bremvåg for selskap på laboratoriet og medstudent Andreas Sandvik for god hjelp i Excel. I tillegg vil jeg takke mine venninner fra klassen som har gjort hele studietiden helt spesiell, og min familie som alltid har tro på meg.

Astrid Lillebjerka,



Trondheim, 15. mai 2019

## Abstract

A change in the food trends of consumers, that include an increased demand for «Ready-to-Eat»- and minimally processed seafood requires new methods and a combination of methods for preservation of seafood. Biopreservation is a mild and unexplored method for preserving of seafood, and usually involves the application of naturally occurring microorganisms and/or their inherent antimicrobial metabolites in a product at certain quantities. Lactic acid bacteria and/or their bacteriocins, bacteriophages and bacteriophage-encoded enzymes may be good candidates, but multiple tests during relevant conditions and a full screening against various environmental factors and processing conditions needs to be done before they can be used. Such screenings will include to check the bacterial isolates ability to inhibit spoilage microorganisms or pathogenic bacteria, the ability to grow at low temperature, contribute to deterioration and quality change and how sensory properties are affected among other things. This study will focus on the inhibition of pathogenic bacteria, which is the first step in the screening process.

The aim of this study was to gain more knowledge about the growth properties of lactic acid bacteria isolated from chilled «Ready-to-eat»-products of smoked salmon, sushi and «gravlaks», and to screen for their inhibitory properties against target organisms. Screening for inhibitory effects was performed by culturing the lactic acid bacteria in a co-culture with the target in enriched fish juice in a 96-well plate at 15 ° C. Quantification of growth was accomplished by spotting (on selected and general media) which is an efficient and resource-saving method for estimating colony count. The lactic acid bacteria were further identified by sequencing of 16S rRNA using universal primers.

A total of 93 of 100 isolates of lactic acid bacterial grew at 15 ° C. Of the selection of 35 lactic acid bacteria isolates screened for inhibitory effect against *L. innocua*, *E. coli* and *S. aureus*, 19 isolates of lactic acid bacteria (54.3%) had inhibitory effect against at least one of the target organisms and 8 isolates of lactic acid bacteria (22.9%) had an inhibitory effect against more than one target. A good inhibitory effect is defined as more than 3.0 log reduction in colony count compared to whether the target organism grows alone. Bacterial isolate No. 461 was

identified as *Carnobacterium* sp. and was the only bacterial isolate with good inhibitory effect against all three target organisms. Spotting as a quantification method worked optimally for *L. innocua*, *E. coli* and lactic acid bacteria, but spotting of *S. aureus* requires optimization. From the sequencing, 29 isolates were identified as *Carnobacterium* sp. and 1 *Leuconostoc* sp. (isolated from sushi), which shows little variation in both genera and between products. However, there was big variation according to the inhibitory effect of *Carnobacterium* spp. A total of 19 lactic acid bacterial isolates have shown good inhibitory effect against at least one target organism and these will be relevant for further screening.

## Sammendrag

En endring i mattrendene hos forbruker som innebærer økt etterspørsel etter spiseferdig og lettprosessert sjømat gjør at det kreves nye metoder og kombinasjon av metoder innenfor konservering av sjømat. Biokonservering er en mild og lite utforsket metode for konservering av sjømat. Med biokonservering menes at naturlig forekommende mikroorganismer og/eller deres antimikrobielle metabolitter tilsettes i et produkt i bestemte mengder. Melkesyrebakterier og/eller deres bakteriosiner, bakteriofager og enzymer produsert av bakteriofager kan egne seg godt til biokonservering, men krever at de har blitt testet under relevante betingelser og at det har blitt utført en full screening mot ulike miljøfaktorer og prosesseringsbetingelser før de kan tas i bruk. Slike screeninger vil inkludere blant annet bakterieisolatenes evne til inhibering av forringelsesorganismer eller patogene bakterier, evne til å vokse ved lav temperatur, bidrag til forringelse og kvalitetsendring og hvordan sensoriske egenskaper påvirkes. Denne oppgaven tar for seg inhibering av patogene bakterier, som er første trinn i screeningen.

Hensikten med oppgaven var å skaffe mer kunnskap omkring vekstegenskapene til melkesyrebakterier isolert fra spiseferdige, kjølelagrede sjømatprodukter av røkelaks, sushi og gravlaks, og screene for deres inhiberende egenskaper mot målorganismene *Listeria innocua*, *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus*. Screening etter inhiberende effekter ble gjennomført ved å dyrke melkesyrebakterien i co-kultur med målorganismen i beriket fiskejuice i 96-brønnsplater ved 15 °C. Kvantifisering av vekst ble gjennomført ved spotting (på selektive og generelle medier) som er en effektiv og ressursbesparende metode for å estimere kimtall. Melkesyrebakteriene ble videre identifisert ved hjelp av sekvensering av 16S rRNA ved hjelp av universelle primere.

Totalt 93 av 100 melkesyrebakterieisolater vokste ved 15 °C. Av utvalget på 35 melkesyrebakterieisolater som ble screenet for inhiberende effekt mot *L. innocua*, *E. coli* og *S. aureus*, hadde 19 bakterieisolater (54,3 %) inhiberende effekt mot minimum en av målorganismene og 8 bakterieisolater (22,9%) en inhiberende effekt mot flere enn en



målorganisme. En god inhiberende effekt defineres som mer enn 3,0 log reduksjon i kimtall sammenlignet med om målorganismen vokser alene. Bakterieisolat nr. 461 ble identifisert som *Carnobacterium* sp. og var eneste bakterieisolat med god inhiberende effekt mot alle tre målorganismene. Spotting som kvantifiseringsmetode fungerte optimalt for *L. innocua*, *E. coli* og melkesyrebakterier, men spotting av *S. aureus* krever optimalisering. Fra sekvenseringen ble 29 isolater identifisert som *Carnobacterium* sp. og 1 *Leuconostoc* sp. (isolert fra sushi), noe som viser lite variasjon i både slekter og mellom produktene. Det var likevel stor variasjon i henhold til den inhiberende effekten hos *Carnobacterium* spp. Totalt 19 av 35 melkesyrebakterieisolater har vist god inhiberende effekt mot minimum en målorganisme, og disse vil være aktuelle for videre screeninger.

# Innhold

1. Bakgrunn for oppgaven .....	1
2. Teori.....	3
2.1. Mikrobiologiske farer i sjømat.....	3
2.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	5
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> .....	5
2.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	6
2.2. Biokonservering .....	7
2.2.1. Kriterier for screening av melkesyrebakterier .....	8
2.3. Melkesyrebakterier .....	11
2.3.1. Taksonomi .....	11
2.3.2. Aktuelle melkesyrebakteriearter til biokonservering .....	12
2.4. Bakteriosiner.....	14
2.4.1. Klassifisering av bakteriosiner .....	16
2.4.2. Viktigste bakteriosiner .....	16
2.5. Bakteriofager og enzymer produsert av bakteriofager .....	17
3. Material og metode.....	19
3.1. Preparering av fiskejuice .....	19
3.2. Oppformering og standardisering av OD mot kimtall .....	20
3.3. Screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene .....	21
3.4. Identifisering av melkesyrebakterier .....	24
3.4.1. Fylogenetisk analyse basert på 16S rRNA sekvenser?? .....	26
3.5. Statistiske analyser .....	26
4. Resultat.....	27
4.1. Vekstegenskaper ved lav temperatur .....	27
4.2. Standardisering av OD mot kimtall for melkesyrebakteriene .....	30

4.3.	Testing av selektive medier til målorganismene ved bruk av spotting .....	32
4.4.	Screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene .....	34
4.4.1.	<i>Listeria innocua</i> .....	34
4.4.2.	<i>Escherichia coli</i> .....	35
4.4.3.	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
4.4.4.	Melkesyrebakteriene mot målorganismene .....	39
4.5.	Identifisering av melkesyrebakterier .....	42
5.	Diskusjon .....	44
5.1.	Vekstegenskaper ved lav temperatur .....	44
5.2.	Standardisering av OD mot kimtall for melkesyrebakterier og målorganismer .....	45
5.3.	Testing av selektive medier til målorganismene ved bruk av spotting .....	46
5.4.	Screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene .....	49
5.5.	Identifisering av melkesyrebakteriene .....	53
6.	Konklusjon .....	56
7.	Referanser .....	57

Vedlegg 1: Oversikt over alle bakterieisolatene

Vedlegg 2: Kvantifiseringsdata

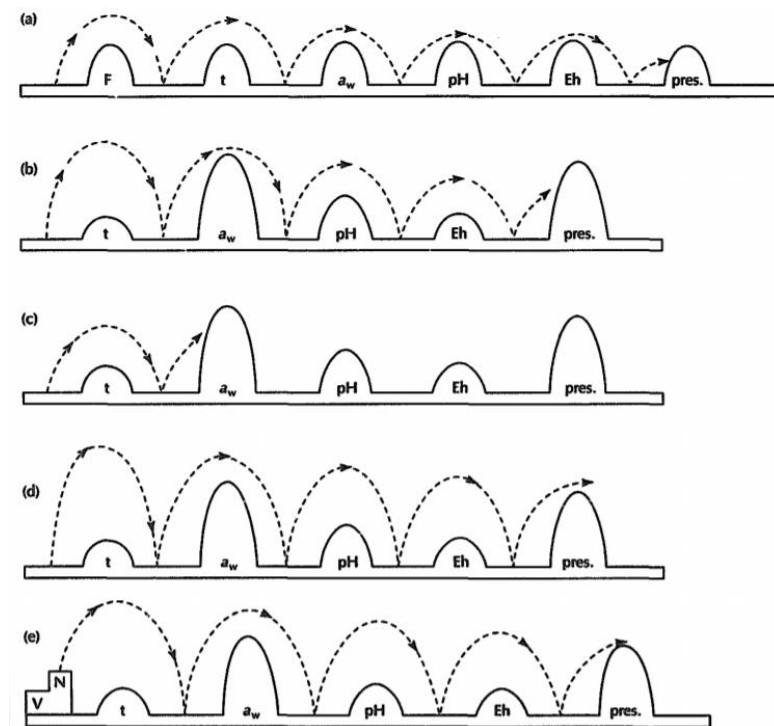
Vedlegg 3: Identifisering etter sekvensering

## 1. Bakgrunn for oppgaven

Sjømat er en god kilde til en rekke næringsstoffer og på verdensbasis har både inntaket og importeringen av sjømat økt betraktelig de siste tiårene (FAO, 2016, s. 4). Dette har også gjort at mengden kontaminert sjømat og antall tilfeller av matforgiftning knyttet til dette har økt (Elbashir *et al.*, 2018). I Norge, sammen med en rekke andre land, er tilfellet at mengden sjømat konsumert har minket de siste årene, spesielt hos unge voksne (Olsen, 2003; SjømatNorge, 2018). Årsaken kan skyldes at det oppfattes som relativt vanskelig å tilberede fisk og sjømatprodukter (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2019). I tillegg ønsker forbrukerne minimalt prosesserte produkter med høy kvalitet (Ghanbari *et al.*, 2013; Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2019). Produktene skal være naturlige med flest mulig næringsstoffer intakt, samt tilsatt minst mulig kjemiske konserveringsmidler (Balciunas *et al.*, 2013; Herrera, 2016, s. 225). «Ready-to-eat», altså spiseferdige produkter, har vært en del av menneskets kosthold siden gamledager, men grunnet de nye mattrendene har utvalget økt betraktelig (Herrera, 2016, s. 226). Ut fra næringsmiddelhygieneforskriften defineres spiseferdige næringsmidler med «Næringsmidler som produsenten eller fabrikanten har framstilt med henblikk på direkte konsum uten at koking eller annen tilberedning er nødvendig for å fjerne, eller redusere til et akseptabelt nivå, uønskede mikroorganismer» (Næringsmiddelhygieneforskriften, 2017). Eksempler på spiseferdige sjømatprodukter er sushi, sashimi, gravet og røkt laks (Kim *et al.*, 2017; Miguéis *et al.*, 2015; Peiris *et al.*, 2009). Fellesbetegnelsen for nevnte produkter er at de ikke bare er spiseferdige, men også minimalt prosessert, tilnærmet rå og konsumeres uten varmebehandling. Dermed vil det heller ikke være et tydelig trinn som fjerner patogene mikroorganismer (Guenther *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2017; Peiris *et al.*, 2009). Forbrukeren ønsker rene, sunne produkter, mens i realiteten kan dette utgjøre en trussel for mattryggheten til produktene (Herrera, 2016, s. 225 og 226).

Sjømat er et lettbederverlig produkt og en kan regne med at omkring 20 % av all sjømat kastes på grunn av mikrobiell degradering (Ghanbari *et al.*, 2013; Leroi *et al.*, 2015). I tillegg er det vanlig at et lavt antall patogener er naturlig tilstede i råmaterialet (Huss, Reilly og Karim Ben Embarek, 2000). Spiseferdige produkter skal ikke overskride en konsentrasjon over 100 kde/g ved utløpsdato for *Listeria monocytogenes* (Drikkevannsforskriften, 2017; Næringsmiddelhygieneforskriften, 2017). Produktene gravlaks og røkelaks har både lang

holdbarhetstid og kan kjølelagres (Løvdal, 2015; Namiq og Milne, 2017). Dette er faktorer som gir den patogene bakterien *L. monocytogenes* god tid på å kunne formere seg, i tillegg til at den vokser ved temperaturer ned til  $-1\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Buchanan *et al.*, 2017; Buchrieser *et al.*, 2003). *Escherichia coli* har også gode forhold for å vokse i slike produkter, og ved tilstedeværelse av *E. coli* indikerer dette fekal forurensning fra forurenset vann eller uhygieniske forhold (Costa, 2013; Miotto *et al.*, 2019). Den patogene bakterien *Staphylococcus aureus* kan også forekomme i spiseferdige produkter grunnet dårlig hygiene, hvor det er direkte kontakt med hendene til den som produserer maten (Liang *et al.*, 2016).



Figur 1: Fem eksempler på hinderteknologi for konservering av mat. De individuelle hindrene kan foregå samtidig eller hver for seg, avhengig av type hinder og total prosessering. De ulike symbolene betyr: F: varmebehandling, t: kjøling, a<sub>w</sub>: lav vannaktivitet, pH: syredannelse, Eh: lavt redokspotensiale, pres: konserveringsmidler, V: vitaminer og N: næringsstoffer (Leistner L. og Gorris, 1995)

For å bevare kvalitet og mikrobiologisk mattrygghet baserer produsenter seg på å kombinere ulike hinder som skal eliminere mikroorganismer eller hindre dem i å vokse frem under lagring (figur 1) (Leroi *et al.*, 2015). Med hensyn til mikrobiell mattrygghet vil kombinasjonen mellom lav temperatur, vannaktivitet og lav pH være de viktigste hindrene i lettprosesserte produkter (Kotzekidou, 2016, s. 40). De nye mattrendene hos forbruker gjør at det kreves nye metoder og kombinasjon av nye metoder innenfor konservering av sjømat, som skal sikre kvalitet og

mattrygghet for produkter som er minimalt prosessert. Eksempler på nye metoder er biokonservering og bestråling (Singh, 2018). Biokonservering er en metode som brukes for å forlenge holdbarheten og sikre mattryggheten, ved at naturlig forekommende mikroorganismer og/eller deres antimikrobielle metabolitter tilsettes i et gitt produkt i bestemte mengder (Ghanbari *et al.*, 2013). Komponenter som kan tilsettes er melkesyrebakterier og/eller deres bakteriosiner, bakteriofager og enzymer produsert av bakteriofager (Singh, 2018). Disse mikroorganismene skal drepe eller hindre vekst av uønskede mikroorganismer, som forringelsesorganismer og patogene bakterier (Saraoui *et al.*, 2017; Wiernasz *et al.*, 2017). Denne oppgaven vil hovedsakelig ta for seg screening av melkesyrebakterier og bakteriosiner. For å biokonservere sjømat vil det være aktuelt å undersøke antimikrobielle metabolitter/mikroorganismer som er naturlig tilstede i produktene og teste under relevante betingelser (Cleveland *et al.*, 2001; Singh, 2018). Hensikten med denne oppgaven var å skaffe mer kunnskap omkring vekstegenskapene til 100 melkesyrebakterieisolat fra røkelaks, sushi og gravlaks, og screene for deres inhiberende egenskaper mot målorganismene *Listeria innocua*, *Escherichia coli* og *Staphylococcus aureus* ved 15 °C. Melkesyrebakteriene ble videre identifisert ved hjelp av sekvensering av 16S rRNA ved hjelp av universelle primere, for å se hvilke slekter bakterieisolatene stammet fra, hvilke bakterieslekter med god inhiberingseffekt og eventuelle forskjeller mellom produktene.

## 2. Teori

### 2.1. Mikrobiologiske farer i sjømat

Med hensyn til mikrobiologiske farer i sjømat kan disse kategoriseres ut fra type sykdom de kan forårsake. Bakterielle farer som assosieres med sjømat og kan forårsake bakterielle infeksjoner er *Aeromonas* spp., *Bacillus cereus*, *Campylobacter* spp., *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp. og *Vibrio* spp. (*V. parahaemolyticus*, *V. cholera*, *V. vulnificus*). Mikroorganismer som kan forårsake bakterielle intoksikasjoner er *Clostridium botulinum* (type E) og *Staphylococcus aureus* (Ghanbari *et al.*, 2013; Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2019). Det ligger også biologiske farer i virus og parasitter som forårsaker infeksjoner, og intoksikasjoner gjennom biotoksiner (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2019). Sjømat er rikt på næringsstoffer som gir gode vekstvilkår for både

forringelsesorganismer og patogene bakterier. Ut fra hvordan patogene bakterier forekommer i sjømat er det mulig å kunne kategorisere de inn i tre grupper. Den første gruppen er bakterier som har naturlig reservoar i naturen, eksempelvis *Clostridium perfringens*, patogene *Vibrio* spp. og *Aeromonas* spp. Den neste gruppen er bakterier som forekommer på grunn av fekal kontaminering eller kontaminering fra miljøet, eksempelvis *Salmonella* spp., patogene *E. coli* eller *S. aureus*. I den siste gruppen forekommer kontaminasjon under prosessering, lagring eller tilberedning før konsumering, eksempelvis *Bacillus cereus*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* og *C. botulinum* (Ghanbari *et al.*, 2013). For å hindre vekst av forringelsesorganismer og patogene bakterier bør kontaminasjonen av råmaterialet reduseres (Calo-Mata *et al.*, 2008).

For minimalt prosessert eller rå sjømat regnes *V. parahaemolyticus* som den største, bakterielle årsaken for matforgiftning innen sjømat på verdensbasis. Utbruddene har som regel sammenheng med konsum av østers, muslinger og blåskjell (FAO og WHO, 2011, s. 5 og 6). Andre agens som *L. monocytogenes* og *E. coli* bør også anses som risikofaktorer grunnet deres tilstedeværelse i rå- eller lettprosesserte sjømatprodukter (Hoel, Vadstein og Jakobsen, 2019). Spiseferdige produkter som prepareres for hånd er ofte involvert ved matforgiftningsutbrudd, hvor hendene ofte er en årsak til krysskontaminering av maten (Kotzekidou, 2016, s. 44). Sushi er et eksempel på et spiseferdig, risikofyllt sjømatprodukt, som har vært knyttet til matforgiftningsutbrudd forårsaket av *V. parahaemolyticus*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Salmonella* og *L. monocytogenes* (FEHD, 2000). Hovedingrediensen i sushi er kokt, kald ris som er tilsatt eddik (Hsin-I Feng, 2012). Andre typiske ingredienser i sushi er laks, tunfisk, kveite, kokt scampi og rå grønnsaker som agurk, vårløk og avokado (Hoel *et al.*, 2015). Fisken som benyttes er som regel rå og dermed har en naturlig tilstedeværelse av patogene bakterier eller parasitter. I tillegg produseres produktet slik at det raskt kan serveres og ingrediensene er i direkte kontakt med matbehandleren, hvor den mikrobiologiske faren ligger i kontaminering av patogene bakterier som *S. aureus*. Sushi er også et produkt som konsumeres uten videre varmebehandling, som reduserer antall mikroorganismer (Liang *et al.*, 2016). De patogene bakteriene som anses som størst problem rundt sushi er *B. cereus* og *S. aureus* (Rachtanapun *et al.*, 2018).

### 2.1.1. *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* er en grampositiv, matbåren bakterie og den største mikrobielle risikoen med lettprosesserte fiskeprodukt (Buchrieser *et al.*, 2003; Leroi *et al.*, 2008, s. 5; Singh, 2018). Både gravet og kaldrøkt laks er to produkter som assosieres med listeriose (Peiris *et al.*, 2009). Bakterien er årsaken til sykdommen listeriose, som i utgangspunktet har relativt lav forekomst for den generelle befolkningen (Buchanan *et al.*, 2017; Leroi *et al.*, 2008, s. 5). Det som derimot gir sykdommen grunn for bekymring er den høye dødeligheten (20-30 %) for utsatte grupper som gravide, eldre og mennesker med nedsatt immunforsvar (Buchanan *et al.*, 2017; Peiris *et al.*, 2009). Bakterien har blitt isolert fra en rekke dyr og finnes naturlig i naturen, men også funnet i miljøet i fiskeforedlingsanlegg hvor det produseres spiseferdige produkter (Buchrieser *et al.*, 2003; Calo-Mata *et al.*, 2008). Bakterien har også evnen til å danne biofilm, slik at om den først befinner seg i produksjonsanlegget vil den være en stor utfordring å bli kvitt (Calo-Mata *et al.*, 2008; Peiris *et al.*, 2009). Kontamineringen kommer enten fra rå fisk eller kan forekomme under prosessering, hvor sistnevnte er den vanligste årsaken (Leroi, 2010; Leroi *et al.*, 2008, s. 5 og 6). Bakterien kan vokse ved ekstreme og stressede forhold, som ved høye saltkonsentrasjoner (10 % NaCl), lave temperaturer (helt ned til -1 °C), et bredt pH-spenn (fra 4,5-9), ved lengre perioder av tørking og frysing, samt anaerobe forhold (Leroi *et al.*, 2008, s. 6; Buchrieser *et al.*, 2003). Grunnet de ekstreme forholdene *L. monocytogenes* kan vokse ved gjør dette det vanskelig å hemme den under de ulike prosesseringstrinnene (Leroi *et al.*, 2008, s. 5 og 6). Den vil også kunne oppformere seg under lagring da den også overlever forholdene i det kjølelagrede vakuumpakkede produktet (Løvdaal, 2015). *L. monocytogenes* er nært beslektet med arten *L. innocua*, som ikke er patogen (Buchrieser *et al.*, 2003). I henhold til denne likheten kan det utføres studier med *L. innocua* som modellorganisme for tryggere omgivelser.

### 2.1.2. *Escherichia coli*

Den fakultative anaerobe gramnegative bakterien *Escherichia coli* finnes naturlig i mage-tarmkanalen hos mennesker og varmblodige dyr (Miotto *et al.*, 2019). Bakterien vil også ha gode forhold for å kunne vokse i spiseferdige produkter, da den kan vokse ned til 8 °C, ved en pH over 4,5 og en vannaktivitet over 0,95 (Kotzekidou, 2016, s. 40; Miotto *et al.*, 2019). De fleste artene er harmløse, samtidig som det eksisterer noen patogene arter (Miotto *et al.*,



2019). Totalt sett finnes det nesten 1000 forskjellige serotyper av *E. coli* i miljøet, hvor de videre kan kategoriseres i serogrupper (Vaiyapuri, Toms C og Lalitha K.V., 2016). *E. coli* regnes også som den beste indikatoren på fekal kontaminering i både vann og sjømat, det vil si at tilstedeværelse av bakterien tyder på kontaminering av forurenset vann eller uhygieniske forhold (Miotto *et al.*, 2019; Vaiyapuri, Toms C og Lalitha K.V., 2016; Costa, 2013). Bakterien brukes dermed som et mikrobiologisk kvalitetsparameter (Costa, 2013). Sykdomsfremkallende *E. coli* forårsaker diaré (Vaiyapuri, Toms C og Lalitha K.V., 2016).

### 2.1.3. *Staphylococcus aureus*

Den grampositive bakterien *S. aureus* er en av de vanligste patogene bakteriene som forekommer i spiseferdige produkter (Aycicek, Cakiroglu og Stevenson, 2005; Singh, 2018). Bakterien har naturlig reservoar i mennesker og dyr, og vil dermed befinne seg blant annet i nesehulen, sår i huden og halsen (Aycicek, Cakiroglu og Stevenson, 2005; Huss, Reilly og Karim Ben Embarek, 2000; Simon og Sanjeev, 2007). Grunnen til at mat kontamineres med bakterien er svikt i hygiene, svikt under lagring eller krysskontaminering (Simon og Sanjeev, 2007). Veksten til *Staphylococcus* begrenses som regel av konkurrerende mikroorganismer, men den trives også i miljøer hvor det er mer eller mindre konkurransefritt, eksempelvis ved høye salt- og sukkerkonsentrasjoner. Toksinet som dannes er høyt varmeresistent, men siden spiseferdige produkter ikke varmebehandles kan mikroorganismen være et problem. *Staphylococcus* vokser ved temperaturene 7-48 °C, mens optimumstemperaturen for toksindannelse er 40-48 °C (Aycicek, Cakiroglu og Stevenson, 2005). Siden bakterien vokser ved lav temperatur vil ikke kjøling alene være tilstrekkelig for å unngå at *S. aureus* vokser opp (Lewus, Kaiser og Montville, 1991). Matforgiftning av *S. aureus* skyldes mat som har vært kontaminert med toksinet, hvor sykdommen resulterer i oppkast, brekninger, magekramper og ofte diare (Ertas Onmaz *et al.*, 2015).

## 2.2. Biokonservering

Biokonservering brukes som en del av hinderteknologi, et konsept som kombinerer flere konserveringsmetoder for å etablere en antimikrobiell effekt som kan forlenge holdbarheten, samtidig forbedre mattryggheten og den sensoriske kvaliteten på maten (Matamoros *et al.*, 2009a). Dette gjøres ved at naturlig forekommende mikroorganismer og/eller deres antimikrobielle metabolitter tilsettes i et gitt produkt i bestemte mengder (Ghanbari *et al.*, 2013). Komponenter som kan tilsettes er melkesyrebakterier og/eller deres bakteriosiner, bakteriofager og enzymer produsert av bakteriofager (Singh, 2018). Disse mikroorganismene skal drepe eller hindre vekst av uønskede mikroorganismer, som forringelsesorganismer og patogene bakterier (Saraoui *et al.*, 2017; Wiernasz *et al.*, 2017). Ved å bruke melkesyrebakterier som er naturlig tilstede i produktet og vokser ved lave temperaturer gjør at de også vil virke inhiberende under lagring ved kjøletemperaturer. Dette gjør dem også mer konkurransedyktig mot forringelsesorganismer, som vanligvis utvikler seg ved denne temperaturen (Matamoros *et al.*, 2009b; Singh, 2018). På samme måte som andre moderne konserveringsmetoder, eksempelvis bestråling, vil biokonservering være bedre enn mer tradisjonelle konserveringsmetoder, med hensyn til å bevare næringsstoffer, aroma og smak i produktet (Singh, 2018). Biokonservering vil også kunne virke kostnadsbesparende for en bedrift ved at holdbarheten forlenges (Gálvez *et al.*, 2007; Namiq og Milne, 2017). En forlenging av holdbarheten vil også virke positivt ved at mengden mat som kastes vil reduseres (Namiq og Milne, 2017).

Sammenlignet med melke- og kjøttprodukter finnes det færre dokumenterte studier omkring biokonservering på sjømatprodukter (Pilet og Leroi, 2010, s. 8). Likevel er det utført noen studier, hvorav mange baserer seg på inhibering av *L. monocytogenes* i produkter som kaldrøkt laks (Ghanbari *et al.*, 2013; Leroi, 2010). Mer konkrete studier rundt bruk av aktuelle melkesyrebakterier beskrives under kapittel 2.3.2. Aktuelle melkesyrebakterieslekter til biokonservering.

### 2.2.1. Kriterier for screening av melkesyrebakterier

For å velge en kultur til biokonservering er det flere kriterier og krav som det må tas hensyn til. Det aller viktigste aspektet er beskyttelse av konsumenten, det vil si at produktet skal være helt trygt å spise av konsumenten. Med dette kreves nok kunnskap rundt selve tilsetningen og hvordan dette vil påvirke produktet, før det eventuelt kan tas i bruk (Ghanbari *et al.*, 2013; Singh, 2018). Det vil i tillegg kreves nye regler og standarder om melkesyrebakterier skal benyttes i mat, selv om de samme stammene er tidligere brukt til fermentering (Rodgers, 2001). I motsetning til kjøtt og melkeprodukter er sjømatprodukter hovedsakelig ikke fermenterte (Pilet og Leroi, 2010, s. 12 og 13). Produkter som for eksempel kaldrøkt laks blir ansett som tradisjonelle, høykvalitetsprodukter og produkter det kanskje ikke ønskes å tilsette flere ingredienser i. Forbrukerne lar seg lett påvirke, slik at om de ser en ukjent ingrediens kan dette medføre at de unngår produktet (Grunert, 2005; Pilet og Leroi, 2010, s. 12 og 13). Dermed hindres utviklingen av biokonserverte produkter fra produsentenes side, da de ikke vil produsere sjømat som det er en fare for at forbrukerne unngår (Pilet og Leroi, 2010, s. 12 og 13).

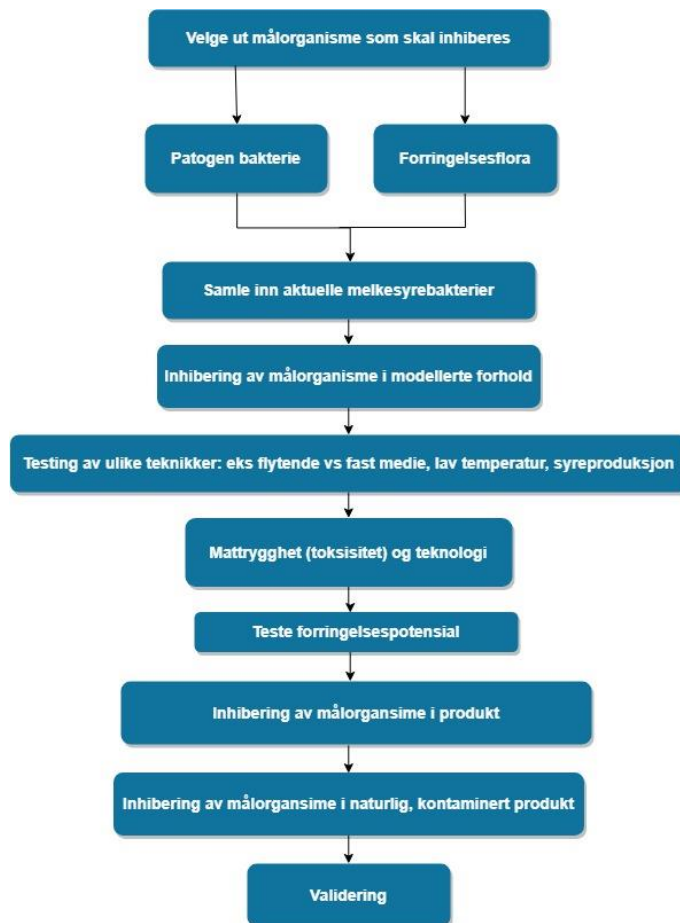
Med hensyn til melkesyrebakteriene som velges ut for videre screening av inhiberende effekter er det særdeles viktig at stammen må være robust. Den må klare å overleve stegene under prosessering, motstå miljøet i maten og respondere raskt på stress, for at den skal være aktuell å bruke (Ghanbari *et al.*, 2013). Generelt sett er melkesyrebakterier relativt robuste da de kan vokse helt ned til kjøleskaptemperatur, tåler MAP og CO<sub>2</sub>, lav pH, høye saltkonsentrasjoner samt tilstedeværelse av melkesyre, etanol eller eddiksyre (Calo-Mata *et al.*, 2008; Gálvez *et al.*, 2007). Likevel er det ikke alle melkesyrebakteriene som tåler for eksempel kjøleskaptemperatur, noe som vil være en begrensning til bruk i kjølelagrede sjømatprodukter (Rodgers, 2001). Et eksempel på en melkesyrebakterie som ikke tåler 4 °C er *Pediococcus pentosaceus* (Crandall, Winkowski og Montville, 1994). Psykrotrofe melkesyrebakterier kan vokse ned til under 5 °C, og inkluderer *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Weisella* spp., *Lactobacillus* spp. (Calo-Mata *et al.*, 2008). Det er blitt utført en del studier omkring utvelgelse av melkesyrebakterier fra flytende medier, for deres antimikrobielle egenskaper. Problemet her er at bakteriene kan gi lovende resultat i flytende medier, men vil fungere dårlig i selve produktet. Dette kan blant annet skyldes at de ikke har hatt optimale

forhold i gitt produkt eller at det produseres uønskede lukter, som igjen ikke er ønskelig i produktet (Leroi, 2010).

Mengden melkesyrebakterier som tilsettes i et produkt vil ikke bare påvirke utviklingen for den biokonserverende effekten, men også den sensoriske kvaliteten til produktet, produktets næringsinnhold og metodens kostnad-effektivitet (Leroi *et al.*, 2008, s. 2; Rodgers, 2001). Konsentrasjoner som tilsettes vil variere ut fra arter, men generelt sett vil det være behov for høye konsentrasjoner for å ha effekt. Videre kan dette medføre nedsatt sensorisk kvalitet ved at produktet smaker surt (Leroi, 2010; Rodgers, 2001). Det ligger også en usikkerhet i rollen melkesyrebakterier har i forhold til deres forringelsespotensiale, hvor det i flere studier ikke er funnet korrelasjon mellom tilstedeværelse av melkesyrebakterier og sensorisk forringelse (Leroi *et al.*, 2001; Hildebrandt og Erol, 1988; Truelstrup Hansen, 1996, s. 61). I tillegg vil forringelsespotensialet kunne variere mellom ulike produkt og art som tilsettes i produktet. Et eksempel på dette er *Lactobacillus alimentarius* som ikke forringer kaldrøkt laks, men marinert sild (Leroi, 2010). Dette betyr at ved å bruke en gitt melkesyrebakterie som konserverende metode vil det ikke nødvendigvis fungere i alle produkter, men det må testes ut for hvert enkelt produkt. Det vil også være utfordrende i henhold til metoden som benyttes når melkesyrebakterier skal tilsettes i mat. Vanligvis spraytørkes melkesyrebakteriene, men det vil være utfordrende å sørge for at melkesyrebakteriene ikke mister sin inhiberende effekt mot enkelte patogene bakterier etter tørking (Calo-Mata *et al.*, 2008). Et eksempel på dette er *Carnobacterium divergens* som mister sin inhiberende effekt mot *S. aureus* etter spraytørking. Andre melkesyrebakterier som tåler denne tørkeprosessen bedre er *Lactobacillus salivarius* og *L. sakei*. Det konkluderes likevel med at spraytørking er en potensiell metode for storskalaproduksjon av tørket pulver som inneholder bioaktive komponenter mot patogene bakterier (Silva *et al.*, 2002).

Tilsetninger av melkesyrebakterier vil være mer usikkert med hensyn til effekt, sammenlignet med kjemiske konserveringsmidler. Dette skyldes at levende mikroorganismer vil være dynamiske og alltid i endring, noe kjemiske konserveringsmidler ikke er. Interaksjonene til melkesyrebakteriene vil være avhengig av vekstraten (både hos melkesyrebakteriene, de

patogene bakteriene og eventuelt toksiner produsert av de patogene bakteriene), som igjen vil være avhengig av type mat de tilsettes i, mengde og hvilke melkesyrebakterier som benyttes (Rodgers, 2001).



Figur 2: Trinnene i en utvelsesprosess for melkesyrebakterier til screening (inspirert av Leroi et al 2015).

Strategien for å velge ut melkesyrebakterier til screening vil variere, men Leroi *et al.* forklarer prosessen i ni steg (figur 2). Det første trinnet starter med å identifisere hvilke uønskede målorganismer som skal hemmes, som er enklere med patogene bakterier sammenlignet med forringelsesorganismer. Forringelse er en mer kompleks prosess, hvor det ofte er forskjellige og ukjente mikroorganismer som spiller inn. Videre i steg to må det samles sammen en samling av melkesyrebakterier som det antas kommer til å fungere. Den første screeningen baserer seg på å inhibere målorganismer ved bruk av stammer fra samlingen melkesyrebakterier under kontrollerte forhold. Videre vil det være behov for å teste ulike teknikker, eksempelvis flytende eller fast medie. Valgt medie vil kunne ha innflytelse på

resultatene. Det kreves blant annet noen taksonomiske og fysiologiske data (syreproduksjon og vekst ved lav temperatur) i forkant (Leroi *et al.*, 2015). De stammene som viser seg å være mest effektive bør velges ut for videre studier (Rodgers, 2001). Inhiberingseffekten av de utvalgte melkesyrebakteriene testes mot målorganismen i steril mat. Til slutt vil det testes i et naturlig kontaminert produkt (Leroi *et al.*, 2015).

### 2.3. Melkesyrebakterier

Melkesyrebakterier er grampositive, ikke-sporedannende, katalase-negative bakterier som både kan være kokker og staver (Calo-Mata *et al.*, 2008). I tillegg er de anaero-aerotolerant og har generelt sett komplekse næringskrav til aminosyrer og vitaminer (Madigan *et al.*, 2012). Melkesyrebakterier egner seg til bruk i biokonservering av flere grunner, og kan både tilsettes alene eller i en cocktail bestående av flere stammer (Saraoui *et al.*, 2017). I mange forskjellige næringsmidler vil melkesyrebakterier dominere floraen naturlig, samt regnes som GRAS (generally recognized as safe) (Calo-Mata *et al.*, 2008; Ghanbari *et al.*, 2013). Melkesyrebakterier produserer et bredt spekter av antimikrobielle metabolitter som fettsyrer, reuterin, diacetyl, acetaldehyd, hydrogenperoksid, bakteriosiner og organiske syrer, hvor de tre sistnevnte produseres i størst mengde (Leroi *et al.*, 2008, s. 5; Singh, 2018; Wiernasz *et al.*, 2017) Mer om bakteriosiner under kapittel 2.3. Bakteriosiner. Organiske syrer, hovedsakelig melkesyre, er med på å gjøre miljøet mer surt og gjør det dermed vanskeligere for andre mikroorganismer å overleve (De Muyck *et al.*, 2004; Singh, 2018). Melkesyrebakterier virker også som konkurrerende mikrobiota til forringelsesorganismer og patogene bakterier (Calo-Mata *et al.*, 2008; Ghanbari *et al.*, 2013).

#### 2.3.1. Taksonomi

Taksonomisk sett inngår melkesyrebakterier i to ulike phylum, kalt Firmicutes og Actinobacteria (Giraffa, 2012). Dette avhenger av mengden G+C (nukleinsyreene Guanin og Cytosin), hvor Firmicutes har et lavt innhold (< 50 %) av G+C, mens Actinobacteria har en høy andel (> 50 %) av G+C (Calo-Mata *et al.*, 2008; Giraffa, 2012; Klein *et al.*, 1998). Videre tilhører melkesyrebakterier i klassen Bacilli, ordenen Lactobacillales og familien *Lactobacteriaceae* (Calo-Mata *et al.*, 2008; Singh, 2018). Sleakter innenfor Firmicutes inkluderer blant annet

*Carnobacterium*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* og *Weisella* (Giraffa, 2012). Actinobacteria inkluderer slekter som *Atopobium*, *Bifidobacterium*, *Corynebacterium* og *Propionibacterium* (Calo-Mata *et al.*, 2008).

Klassifisering av melkesyrebakterier baserer seg på morfologiske, metabolske og fysiologiske kriterier (Calo-Mata *et al.*, 2008). På grunn av at mange melkesyrebakterier har like nærings- og vekstkrav kan det være vanskelig å identifisere melkesyrebakterier ved hjelp av tradisjonelle metoder. Nye, genotypiske metoder gir bedre forståelse for mikrobiell diversitet og evolusjonære avstander, som for eksempel 16S rRNA sekvensering (Balcazar *et al.*, 2007; Obis, Paris og Ouwehand, 2019). Denne metoden baserer seg på rekkefølgen av basesekvensene på 16S-genet (rRNA), og egner seg godt da genet finnes i alle bakterier (Obis, Paris og Ouwehand, 2019; Janda og Abbott, 2007). Sekvensene til prøven blir sammenlignet opp mot sekvenser i en database (eksempelvis NCBI) (Temmerman, Huys og Swings, 2004).

### 2.3.2. Aktuelle melkesyrebakteriearter til biokonservering

Det er utført flere studier ved bruk av ulike melkesyrebakteriearter til biokonservering, hvor de har lyktes med å inhibere eller utsette veksten av patogene bakterier (tabell 1). De fleste studiene har hatt som mål å inhibere *L. monocytogenes* eller *L. innocua*, men det er også blitt utført noen studier på både *E. coli* og *S. aureus*.

Tabell 1: Melkesyre bakterier fra tidligere studier som har vist seg å ha biokonserverende effekt.

Melkesyrebakterie(r)	Målorganisme(r)	Produkt	Referanse	Reduksjon (kde/ml)
<i>Carnobacterium divergens</i> og <i>C. maltaromaticum</i>	<i>L. monocytogenes</i> og <i>L. innocua</i>	Sjømatprodukter pakket i MAP	(Groth Laursen <i>et al.</i> , 2005)	Ikke oppgitt
<i>C. divergens</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Kokte, pillede reker	(Saraoui <i>et al.</i> , 2017)	2,0-5,0 log
<i>Lactobacillus curvatur/sakei</i>	<i>L. innocua</i> , <i>S. aureus</i> og <i>Brochothrix</i> spp.	Spekepølse	(Castro <i>et al.</i> , 2011)	Ikke oppgitt
<i>Lactococcus piscium</i>	<i>L. monocytogenes</i>	Kokte, pillede reker	(Fall <i>et al.</i> , 2010)	3,4 log
<i>Leuconostoc</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	Reke-ekstrakt	(Jeppesen og Huss, 1993)	3,0 log
<i>Lactobacillus casei</i> og <i>L. plantarum</i>	<i>L. innocua</i>	Kaldrøkt laks	(Vescovo, Scolari og Zacconi, 2006)	3,3 log og 2,8 log
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>E. coli</i>	Biff	(Smith <i>et al.</i> , 2005)	3,0 log
<i>Lactococcus lactis</i>	<i>E. coli</i>	Rå kylling	(Brashears, Reilly og Gilliland, 1998)	Ikke oppgitt
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	<i>S. aureus</i>	Lam	(Lewus, Kaiser og Montville, 1991)	Ikke oppgitt
<i>Lc. piscium</i>	<i>S. aureus</i>	Kokte, pillede reker	(Matamoros <i>et al.</i> , 2009a)	2,0 log

Det er blitt utført en studie på melkesyrebakterier i spekepølse og undersøkt deres antimikrobielle aktivitet mot *L. innocua*, *S. aureus* og *Brochothrix* spp. Under studien ble det ene isolatet identifisert som *Lactobacillus curvatus/sakei*, og viste seg å produsere et varmestabilt bakteriosin, som også var effektivt etter kjølelagring og effektivt mot patogener når de ble produsert under kjøletemperatur og ved en saltkonsentrasjon på 3 % (Castro *et al.*, 2011). Det er blitt utført flere studier hvor de konkluderer med at *C. divergens* og *C. maltaromaticum* har en inhiberende effekt både mot *L. monocytogenes* og *L. innocua* i sjømatprodukter (Groth Laursen *et al.*, 2005; Saraoui *et al.*, 2017). En studie utført av Vescovo,



Scolari og Zacconi reduserte de *L. innocua* fra 3,3 til 2,8 log ved bruk av stammene *L. casei* og *L. plantarum* uten å påvirke selve produktet (Vescovo, Scolari og Zacconi, 2006).

Studier med *E. coli* som målorganisme for inhibering er utført i produktene biff og rå kylling. Under studiene ble det funnet ut at melkesyrebakteriene *L. acidophilus* og *L. lactis* hadde inhiberende effekter (Brashears, Reilly og Gilliland, 1998; Smith *et al.*, 2005). Førstnevnte melkesyrebakterie har også vist seg å virke inhiberende mot *S. aureus* i en studie utført på blant annet produktene råmelk og ostemasse (Nigam *et al.*, 2012).

#### 2.4. Bakteriosiner

Bakteriosiner er antimikrobielle peptider eller proteiner som produseres av bakterier og deriblant melkesyrebakterier (Yang *et al.*, 2014). Melkesyrebakterier produserer flere ulike bakteriosiner. De fleste bakteriosiner har et smalt spekter hvor de er aktive, det vil si at de er aktive mot den samme arten som produserer den, men selve produsenten er immun. Andre bakteriosiner har et bredere spekter hvor de virker aktive, som både kan være aktive mot samme slekt, men også andre slekter og arter (Gray *et al.*, 2018). Det som skiller bakteriosiner fra antibiotika er hovedsakelig at antibiotika har et bredere spekter av aktivitet, og begrenser ikke aktiviteten mot nært relaterte arter (Zacharof og Lovitt, 2012). Antibiotika er i tillegg forbudt å benytte i matprodukter (Yang *et al.*, 2014). Bakteriosiner egner seg godt til å bruke som naturlig konservering i mat for å forlenge holdbarheten, og regnes som et naturlig produkt siden det er enten peptider eller proteiner (Yang *et al.*, 2014). De vil også virke som en naturlig barriere mot patogene- og forringelsesorganismer, og bakteriosinene har også en evne til å drepe konkurrerende mikrobiota, slik at de selv beholder sin populasjon (Yang *et al.*, 2014; Zacharof og Lovitt, 2012).

Den antimikrobielle aktiviteten til bakteriosiner vil være avhengig av blant annet mengde tilsatt, type bakteriosin, betingelser under tilsetting, pH og temperatur i produktet (Castro *et al.*, 2011). Det har vist seg at bakteriosiner har en effektiv virkning selv ved lav konsentrasjon og pH, og ved pH under 5 vil bakteriosinet være mer effektivt enn ved høyere pH (Rodgers, 2001; Zacharof og Lovitt, 2012). Den sensoriske kvaliteten vil ikke påvirkes ved bruk av

bakteriosiner, i tillegg til at de degraderes lett og harmløst av proteolytiske enzymer i mage-tarm systemet hos pattedyr (Rodgers, 2001; Silva, Silva og Ribeiro, 2018; Yang et al., 2014). Det anbefales likevel å bruke bakteriosiner som et ekstra konserveringstrinn sammen med andre hinderteknologier, og ikke alene (Deegan et al., 2006). Siden GRAS-status også gjelder for melkesyrebakterienes produserte metabolitter, vil dermed bakteriosinene også ha GRAS-status (Zacharof og Lovitt, 2012). En begrensning rundt bruk av bakteriosinogene kulturer vil derimot være at for eksempel målorganismen kan utvikle resistens mot bakteriosinene, og bakteriosinene vil dermed miste sin effekt (Ben Embarek, Jeppesen og Huss, 1994). En annen begrensning vil være bakteriosinenes mer eller mindre manglende evne til å kunne inhibere gramnegative bakterier. Den ytre membranen i celleveggen hos gramnegative bakterier fungerer som en permeabel barriere mot makromolekyler og hydrofobe løsninger, som for eksempel bakteriosiner (Rodgers, 2001). Til tross for at bakteriosinene vil være mest effektiv mot grampositive bakterier, inkludert patogener som *L. monocytogenes*, *Bacillus cereus* og *S. aureus*, vil de også kunne inhibere noen skadde, gramnegative bakterier (Singh, 2018).

Tilsetning av bakteriosiner kan gjøres ved å benytte forskjellige metode. En metode er å inokulere produktet med melkesyrebakterier som produserer bakteriosiner. En annen metode er å kun tilsette bakteriosiner, i ren eller semi-ren form, hvor de tilsettes som et tilsetningsstoff. En siste metode er å bruke et fermentert produkt som inneholder en bakteriosinproduserende stamme, som en ingrediens i prosessering av mat (Castro *et al.*, 2011). Det vil være mange fordeler med bruk av bakteriosiner som ingrediens eller tilsetningsstoff i mat, men for at dette skal la seg gjennomføre er en avhengig av en lav pris, noe som kan være utfordrende (Silva, Silva og Ribeiro, 2018; Singh, 2018). Det ligger fremdeles også lite forståelse for hvordan ulike faktorer påvirker overlevelse og aktivitet til bakteriosinproduserende melkesyrebakterier. Med mer kunnskap vil det også være lettere å få etablert en enda bedre måte å benytte seg av bakteriosiner som konserveringsmiddel (Ananou *et al.*, 2019, s. 483). For at bakteriosiner skal godkjennes for bruk i mat må de identifiseres og karakteriseres, samt bruken og effektiviteten må dokumenteres (Cleveland *et al.*, 2001).

#### 2.4.1. Klassifisering av bakteriosiner

Bakteriosiner klassifiseres forskjellig fra om det er grampositive- eller gramnegative bakterier, hvor melkesyrebakterier er de vanligste produsentene hos grampositive. Til tross for stor diversitet innad i bakteriosiner produsert fra grampositive bakterier vil det likevel være noen likheter. Hovedsakelig deles disse bakteriosinene inn i tre forskjellige hovedklasser og videre inn i ulikt antall undergrupper. I den første klassen så inngår modifiserte peptider og lantibiotika, hvor antall aminosyrer er mindre enn 28. Eksempler på bakteriosiner fra klasse 1 er nisin, mersacidin, labyrinthopeptins A2 og subtilisin A. Bakteriosinklasse 2 har 30-60 aminosyrer og egenskaper som for eksempel varmetoleranse. Eksempler fra denne klassen er bakteriosinene pediocin PA-1, carnobacteriocin X, enterocin AS-48, lactococcin A og microcin E492. Klasse 3 innebærer bakteriosiner med høy molekylær vekt, som er ustabil mot varme (Yang *et al.*, 2014). Dette er den bakteriosinklassen som det eksisterer minst kunnskap omkring (Cleveland *et al.*, 2001). Klasse 3 deles inn i gruppe A og B, hvor enterolisins A, Caseicin 80 og Helveticin J er eksempler som inngår i bakteriosinklassen (Yang *et al.*, 2014).

#### 2.4.2. Viktigste bakteriosiner

Det kan antas at 99 % av alle bakterier produserer bakteriosiner, men de fleste er enda ikke blitt identifisert (Yang *et al.*, 2014). Et nytt bakteriosin kalt sonorensin har vist seg effektivt mot *S. aureus* i biofilm. LDPE-film som inneholder sonorensin har vist seg å være effektivt mot patogene bakterier som *L. monocytogenes* og *S. aureus* (Singh, 2018). Det vanligste bakteriosinet produsert av melkesyrebakterier er nisin, samt det eneste bakteriosinet som er godkjent for å tilsettes rent i mat (Calo-Mata *et al.*, 2008; Juturu og Wu, 2018; Singh, 2018). Nisin produseres av *Lactococcus lactis* og har blant annet blitt brukt for å inhibere vekst av *S. aureus* i osteindustrien (Singh, 2018; Yang *et al.*, 2014). Bakteriosinet har også bevist effekt mot at det virker på grampositive forringelsesbakterier og matbårne patogener som *L. monocytogenes* (Singh, 2018). Pediocin er et bakteriosin som har vist seg å være mer effektivt mot de patogene bakteriene *L. monocytogenes*, *S. aureus* og *E. coli*, sammenlignet med nisin (Jamuna og Jeevaratnam, 2004; Cintas *et al.*, 1998; Eijsink *et al.*, 1998). Til tross for stort potensiale er det likevel få studier som har undersøkt dette bakteriosinet (Silva, Silva og Ribeiro, 2018).

Carnobacteriosiner produseres av *C. maltaromaticum*, som er varmestabile bakteriosiner og stabile over et bredt pH-spekter. Disse bakteriosinene virker effektivt mot andre melkesyrebakterier og *L. monocytogenes* (Calo-Mata et al., 2008). Andre bakteriosiner som har vist seg å være effektiv mot *L. monocytogenes* er enterocin og lactisin. Enterocin produseres av *Enterococcus faecalis*, og er godkjent som et probiotikum. Enterokokker har en antimikrobiell aktivitet mot nært beslektede grampositive bakterier som for eksempel *Listeria* (Calo-Mata et al., 2008). Enterocin AS-48 har vist seg å være aktiv mot *Bacillus* og *Clostridium* sp., og er et av de mest studerte bakteriosinene. Bakteriosinet har i tillegg vist høy stabilitet til varme og endringer i pH, som er to faktorer som kan gjøre det aktuelt for tilsetning i mat. Til tross for at bakteriosinet kan være aktivt mot *Listeria* spp. og *Clostridium* spp., er det likevel ikke sikkert at bakteriosinet kan hindre gjenvekst av nevnte patogener utover lagringstiden (Silva, Silva og Ribeiro, 2018). Lactisin produseres av enkelte stammer av *Lactococcus lactis* og består av lacticin 3147 og lacticin 481. Sistnevnte uttrykker stor antimikrobiell aktivitet mot et bredt spekter av patogene bakterier og forringelsesorganismer (Silva, Silva og Ribeiro, 2018). Et pulver av lacticin 3147 har vist seg effektivt for å kontrollere veksten av *Listeria* og *Bacillus* i diverse melkeprodukter. Likevel ble pulveret regnet som å være upraktisk da det tilsvarte 10 % av produktvekten og det var høye kostnader involvert i tilsetningen (Morgan et al., 2001). Melkesyrebakterien *L. plantarum* anses å kunne produsere minst seks ulike bakteriosiner: plantarisin JK, plantarisin EF, plantarisin S og plantarisin W (Zacharof og Lovitt, 2012).

## 2.5. Bakteriofager og enzymer produsert av bakteriofager

Som nevnt innledningsvis er det også mulig å benytte bakteriofager som en tilsetning i produkt, for å ha biokonserverende egenskaper. Bakteriofag eller fag er naturlig tilstede mange steder i miljøet og representerer en del av den naturlige mikrobiotaen i mye forskjellig mat (Guenther et al., 2009; Singh, 2018). Dette er virus som infiserer og formerer seg hos bakterier, og stort sett harmløse for mennesker, dyr og planter. De fleste bakteriofagene tilhører ordenen *Caudovirales* og kan derfra klassifiseres inn under tre ulike familier: *Myoviridae*, *Siphoviridae* og *Podoviridae*. Bruken av bakteriofager i forbindelse med biokonservering har svært få studier i forbindelse med tilsetning i sjømat (Pilet og Leroi, 2010, s. 10). Et eksempel derimot er Guenther et al. Som brukte bakteriofager i røkt laks og diverse sjømat som var kontaminert med *L. monocytogenes*. Deres beste resultat var en inhibering med 2 log kde/g reduksjon

(Guenther *et al.*, 2009). Bakteriofager kan også brukes til å redusere eller fullstendig inhibere kolonisering av *S. aureus* i nese og huden hos matbehandlere (Mann, 2008). Bakteriofager er en naturlig fiende for bakterier og av den grunn vil de også være godt egnet for å kontrollere veksten av de patogene bakteriene som kan forekomme i spiseferdige produkter. For vertsbakterien er bakteriofagene ekstremt spesifikk og krysser heller ikke ulike arter. Bakteriofager fungerer slik at de kun eliminerer den utvalgte målorganismen uten å svekke levedyktigheten til andre mikroorganismer. På denne måten kan en beholde kvaliteten i mat, spesielt i fermenterte produkter (Guenther *et al.*, 2009).

Endolysin er et fagderivert lytisk enzym som degraderer peptidoglykanlaget hos grampositive bakterier (García *et al.*, 2010; Schmelcher og Loessner, 2016; Singh, 2018). Stort sett har endolysin et smalt spekter med lytisk aktivitet og ofte begrenset til aktivitet mot bakteriehosten, men likevel forekommer det noen unntak (Singh, 2018). Et endolysin produsert av enterokokker lyserer i tillegg til enterokokker også *Streptococcus pyogenes* og *S. aureus*, som gjør den til det endolysinet med bredest spekter identifisert hittil (García *et al.*, 2010). Fordelen med endolysiner er at det per dags dato ikke er rapportert noe resistens imot det. Et bruksområde for endolysin kan være å hindre oppblomstring av *S. aureus* i pasteurisert melk (Singh, 2018). Det er få studier som har undersøkt effektiviteten til endolysiner i matprodukter, og tilnærmet alle omhandlet aktivitet i kumelk (Schmelcher og Loessner, 2016).

### 3. Material og metode

#### 3.1. Preparering av fiskejuice

Salma lakseloin (500 gram) ble blandet sammen med dobbel mengde avionisert vann (1 liter) i en blender (bilde 1). Miksen ble videre kokt i 2 minutter før filtrering gjennom et 185 mm foldefilter (Schleicher & Schuell Ref. No. 311 647), for å fjerne store partikler (bilde 2). Til slutt ble fiskejuicen sterilisert ved 100 °C i 30 min før den ble lagret ved -42 °C frem til bruk.



Bilde 1: Laks og vann i blender (foto: eget)



Bilde 2: Filtrering i foldefilter av fiskejuice (foto: eget)

Fiskejuicen ble tint i romtemperatur før bruk. Videre ble 90 ml fiskejuice supplert med 10 ml fosfatbuffer 1 gram D (+)-glukosemonohydrat (Merck 1.08342.1000) og 1,5 gram natriumklorid (VWR 27810295). Fosfatbufferen ble laget av 1 M  $K_2HPO_4$  (Merck 1051011000) og 1 M  $KH_2PO_4$  (Merck 1048731000) til et blandingsforhold som ga pH 6,7 (Wiernasz *et al.*, 2017).

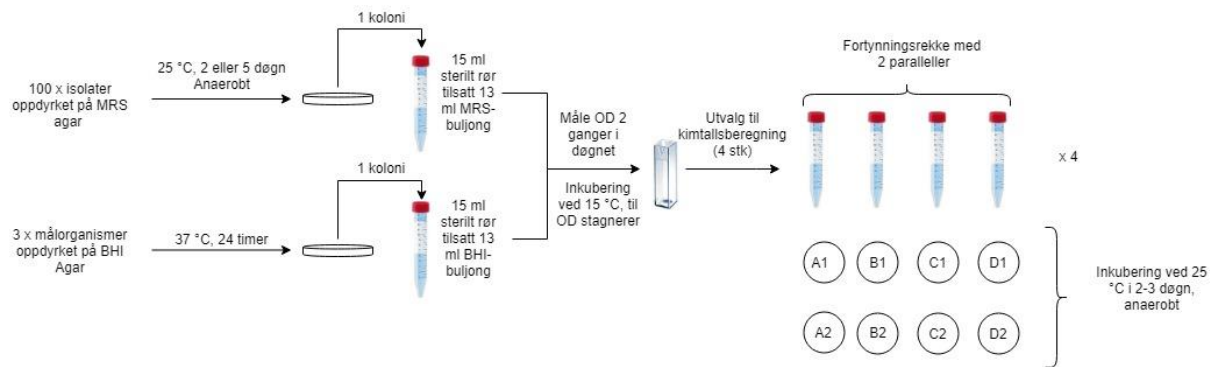


Bilde 3: Ferdig beriket og sterilfiltrert fiskejuice (foto: eget)

Beriket fiskejuice ble sterilisert gjennom 0,45  $\mu\text{m}$  sprøytefilter, for å fjerne mindre partikler (VWR 514-0063) (Wiernasz *et al.*, 2017). Ferdig beriket og sterilfiltrert fiskejuice ble oppbevart i et sterilt rør frem til det videre ble overført i brønnplate (bilde 3).

### 3.2. Oppformering og standardisering av OD mot kimtall

Melkesyrebakteriene som ble benyttet var isolert fra ulike produsenter av de spiseferdige produktene røkelaks, sushi og gravlaks (vedlegg 1). Disse isolatene har ligget i fryseren ved -80 °C i over 5 år. Totalt 100 bakterieisolater ble tatt opp fra fryseren og videre sådd ut på petriskål med De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar (Oxoid CM0361) (figur 3). Videre ble isolatene inkubert anaerobt ved 25 °C i enten 2 eller 5 døgn, avhengig av veksthastigheten. Etter inkubering ble én koloni fra petriskålen overført i et sterilt rør med 13 ml MRS-buljong (Oxoid CM0359), for så å bli inkubert på nytt ved 15 °C (Wiernasz *et al.*, 2017). Videre ble optisk tetthet (OD) (600 nm) målt to ganger daglig ved hjelp av et spektrofotometer (Shimadzu UV-1800) på samtlige isolater. For isolater med lang nølefasen ble OD kun målt en gang i døgnet, frem til veksten gikk over i eksponentiell fase. Målingene ble avsluttet etter hvert som bakterieisolatene nådde stasjonær fase. For å kunne standardisere veksten og videre sammenligne kimtall mot OD, ble det gjort et utvalg på totalt 4 ulike melkesyrebakterieisolater. Hos de utvalgte isolatene ble det laget en fortyningsserie med to paralleller og videre sådd ut på MRS Agar for beregning av kimtall. Skålene ble deretter inkubert ved 25 °C anaerobt og telt etter 2 og 3 døgn. Uttak til kimtallsberegning ble gjort en gang i døgnet frem til OD-verdiene hadde stagnert og OD-måling ble avsluttet. Videre kunne det antas at resterende isolater hadde lik vekst som utvalget hadde. Målet var å oppnå en bakteriekultur med konsentrasjon på  $10^8$  kde/ml, som kunne benyttes for å screene etter inhiberende effekt mot målorgansimene, samt vite hvilken OD dette tilsvarte. Ved å løse likningene (ut fra trendlinjene av punktene som var i eksponentiell fase) for hvert av de utvalgte bakterieisolatene (figur 9) med konsentrasjon ( $x$ ) på  $5 \cdot 10^8$  kde/ml ble OD-verdiene henholdsvis 0,20, 0,22, 0,37 og 0,16 for bakterieisolatene nr. 27, 60, 204 og 273. Dette ga en gjennomsnittlig OD-verdi på 0,24, og det ble valgt et tillatt avvik på 10 % for fremtidige OD-målinger ( $\pm 0,02$ ), som ble benyttet videre under screeningen etter inhiberende egenskaper.



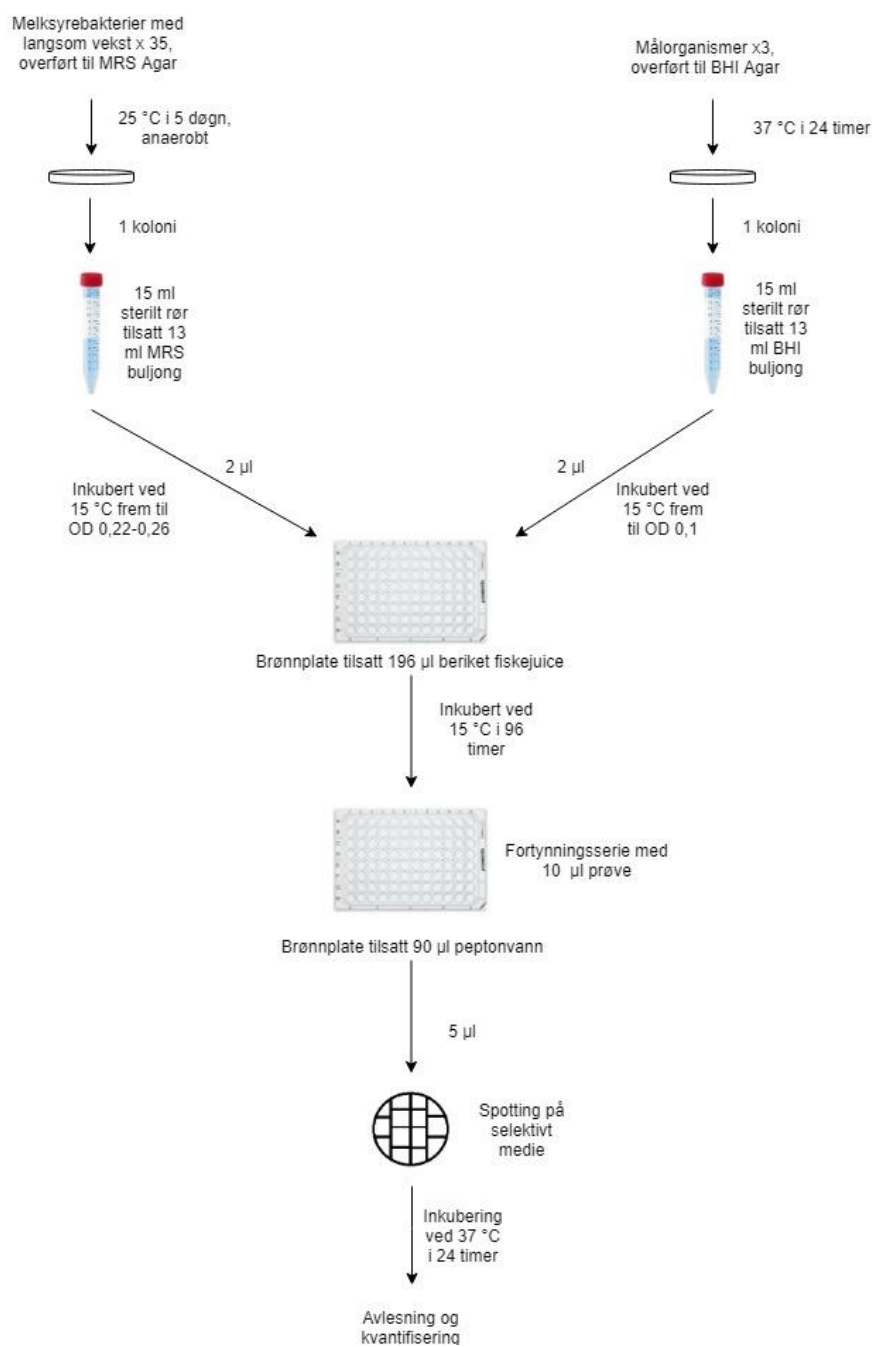
Figur 3: Fremgangsmåte under standardisering av OD mot kimtall.

Målorganismene (*L. innocua*, *S. aureus* og *E. coli*) ble oppdyrket på Brain Heart Infusion (BHI) Agar (Oxoid CM1136) ved 37 °C i 24 timer. Videre ble en koloni av målorganismene overført i et sterilt rør med 13 ml BHI-buljong (Oxoid CM1135), for så å bli inkubert ved 15 °C både med (150 rpm) og uten risting. På samme måte som hos melkesyrebakterieisolatene ble det målt OD to ganger daglig, og prøverørene ble inkubert frem til veksten hadde nådd stasjonær fase. Samtlige målorganismer ble sådd ut på petriskål med BHI Agar for beregning av kimtall, en gang i døgnet med to paralleller. Petriskålene ble videre inkubert ved 37 °C og kvantifisert etter et døgn. Målet var å ha en bakteriekultur med en konsentrasjon på  $10^4$  kde/ml, samt vite hvilken OD dette tilsvarte (Wiernasz *et al.*, 2017). Grunnet varierende resultat ble det istedenfor benyttet en kalkulator på nett. Resultatet derfra viste at en OD på 1,0 tilsvarer en konsentrasjon på  $8 \cdot 10^8$  kde/ml (Bacterial cell number (OD600), u.å.).

### 3.3. Screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene

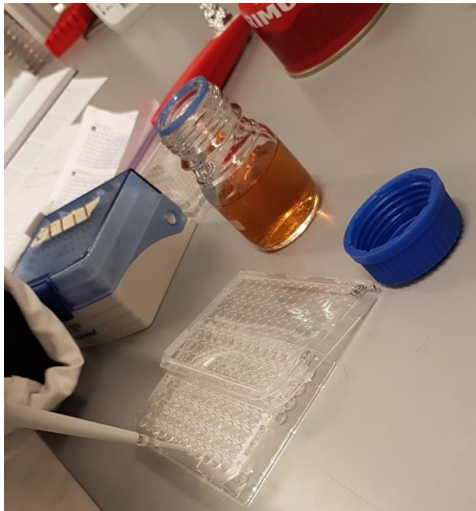
For screeningen etter inhiberende egenskaper mot målorganismene *L. innocua*, *E. coli* og *S. aureus* ble det tatt et utvalg på totalt 35 melkesyrebakterieisolater. Melkesyrebakteriene og målorganismene ble overført på en ny petriskål med henholdsvis MRS Agar og BHI Agar, for så å bli overført i MRS- og BHI-buljong (figur 4). Inkubering i buljong foregikk ved 15 °C frem til OD-verdien nådde 0,22-0,26 for melkesyrebakteriene og 0,1 for målorganismene. Siden ønsket celletetthet på bakteriekulturen var  $10^4$  kde/ml måtte prøven fortynnes 1:1000 fra OD-verdi 0,1 (som tilsvarer  $8 \cdot 10^7$  kde/ml).





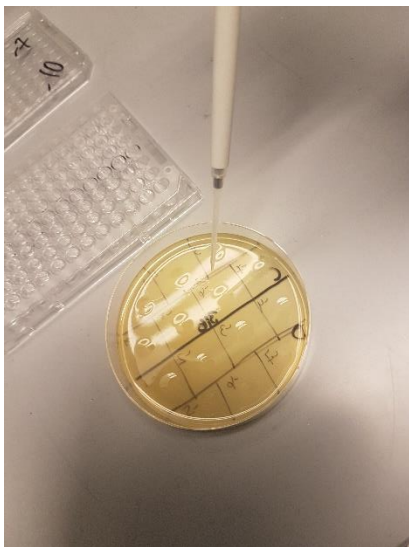
Figur 4: Trinnene under screeningen etter inhiberende egenskaper mot målorganismene.

Det ble overført 2 µl melkesyrebakterier og 2 µl målorganismer i en brønnplate med 96 brønner sammen med 196 µl fiskejuice, som ga et innhold på 200 µl i hver brønn. Melkesyrebakteriene og målorganismene ble fortynnet til henholdsvis  $10^6$  kde/ml og  $10^2$  kde/ml ved overførselen til brønnplate.



Bilde 4: Tilsetting av MRS- og BHI buljong i brønnplaten (foto: eget)

Det ble også laget kontroller som inneholdt kun fiskejuice (200  $\mu$ l), målorganisme alene og melkesyrebakterie alene. For at pH i brønnen skal være tilnærmet lik ble kontrollen med kun målorgansime (2  $\mu$ l) i tillegg tilsatt 2  $\mu$ l MRS-buljong og kontrollen med kun melkesyrebakterier (2  $\mu$ l) tilsatt 2  $\mu$ l BHI-buljong (bilde 4). Hver prøve hadde 4 paralleller, som tilsvarer en halv kolonne i brønnplaten. Videre ble brønnplaten inkubert i 96 timer ved 15 °C.



Bilde 5: Spotting fra brønnplate med peptonvann til MRSA (foto: eget)

Videre ble det laget en fortynningsserie, hvor 10  $\mu$ l prøve ble overført i ei ny 96-brønnsplate med 90  $\mu$ l peptonvann (1g/L Pepton Oxoid LP0034, 8,5 g/L NaCl), i hver brønn og videre fortynnet derfra. Det ble deretter spottet 5  $\mu$ l fra prøvene som inneholdt både

melkesyrebakterier og målorganisme (bilde 5), i tillegg til kontroll med målorganisme, på et selektivt medie for målorganismen (tabell 2) (Wiernasz *et al.*, 2017). Kontrollprøven for målorganismen ble i tillegg spottet på BHI Agar. For å sjekke at fiskejuicen ikke var kontaminert ble også den spottet på BHI Agar. Kontrollprøvene med melkesyrebakterie alene ble spottet på MRS Agar. I forkant av spottingen hadde skålene blitt tørket i minimum en time i et inkubatorskap ved 37 °C, for å unngå at spottene rant utover.

Tabell 2: Oversikt over vekstmedier og inkuberingsbetingelser til utvalgte målorganismer.

Bakterie	Vekstmedie	Inkuberingsbetingelser
<i>L. innocua</i>	Brilliance <i>Listeria</i> Agar (Oxoid CM1080) med Brilliance <i>Listeria</i> Selective Supplement (Oxoid SR0226E)	24-48 timer ved 37 °C
<i>E. coli</i>	Violet Red Bile Agar (VRBA) (Oxoid CM0107)	Opptil 24 timer ved 37 °C
<i>S. aureus</i>	Baird Parker (BPA) (Oxoid CM0275) tilsatt Egg Yolk tellurite Emulsion (Merck 1037850001)	24 timer ved 37 °C

Melkesyrebakteriene ble inkubert anaerobt ved 25 °C i 5 dager og kvantifisert etterpå. Inkuberingsbetingelsene for de ulike selektive mediene til målorganismene vises i tabell 2, hvor veksten på skålene ble kvantifisert etter gitt inkubering. Prøvene som ble inkubert på BHI Agar ble inkubert ved 37 °C og kvantifisert etter 1 døgn. Kvantifiseringen ble utført ved å sammenligne målorganismekonsentrasjon med og uten tilsetning av melkesyrebakterier, opp imot hverandre. Spotter med  $\geq 50$  kolonier ble regnet som overgrodde (Wiernasz *et al.*, 2017).

#### 3.4. Identifisering av melkesyrebakterier

Fra oppformert melkesyrebakteriekultur, som ble brukt til screeningen, ble det tatt ut 1 ml som videre ble sentrifugert ved 8000 rpm i 5 minutter. Væsken ble pipettert ut og pelleten ble fryst ned ved - 20 °C. Videre ble DNA ekstrahert ved hjelp av *DNeasy Blood and Tissue Kit* (QIAGEN: Cat 69506), hvor protokollen for grampositive bakterier ble benyttet. I forbindelse

med ekstrahering ble det laget en enzymatisk lysisbuffer, bestående av 20 mM Tris-Cl, 2 mM Natrium EDTA, 1,2 % Triton X-100 og nukleasefritt vann.

PCR ble satt opp med 5 µl ekstrahert DNA og 45 µl mastermiks for hver av prøvene, etter instruksjoner fra manualen. Mastermiksen besto av 5 µl 10x PCR-buffer (QIAGEN: Cat 203205), 1 µl dNTP (QIAGEN: Cat 201901), 2 µl av hver prime0 (sluttkonsentrasjon på 0,2 µM), 0,25 µl Hot Star Taq (enzym) (2,5 U/reaksjon) (QIAGEN: Cat 203205) og 34,75 µl nukleasefritt vann. Primerne som ble benyttet var 338F (5`-3`) ACTCCTACGGGAGGCAGCAG (Sigma Aldrich) (Muyzer, de Waal og Uitterlinden, 1993) og 1492R (5`-3`) TACGGYTACCTTGTTACGACT (Sigma Aldrich) (Turner *et al.*, 1999). Det ble i tillegg satt opp negativkontroll med nukleasefritt vann istedenfor DNA, som indikator på at det ikke hadde forekommet kontaminasjon av annet DNA. Prøvene ble amplifisert ved bruk av VWR Collection Thermal DOPPIO med følgende innstillinger: En initieringsfase og aktiviseringsfase for enzymet på 95 °C i 15 minutter, etterfulgt av en amplifisering på 30 sykluser ved 95 °C i 1 minutt (denaturering), 58 °C i 30 sekunder (hybridisering) og 72 °C i 1 minutt (polymerisering). Til slutt ble det kjørt et ekstra elongeringstrinn ved 72 °C i 5 minutter (Lerfall, Thomassen og Jakobsen, 2018).

Etter utført PCR ble DNA detektert på en 1 % agarosegel av 1x TAE buffer (1,5 g agarose (Lonza: Cat 50004) i 150 ml TAE), farget med 8 µl GelRed Nucleic Acid Gel Stain (Biotium: Cat 41003). Før prøvene ble tilsatt brønnene ble 10 µl prøve tilsatt 2 µl Gelpilot Loading Dye 6x (Fermentas: Cat R0619), hvor det videre ble tilsatt 10 µl i hver av brønnene. I første og siste brønn ble det tilsatt 6 µl Gelpilot 1 kb Plus DNA Ladder (100) (QIAGEN: Cat 239095). Gelelektroforesen forløp ved 70 volt i omtrent 1 time. I etterkant ble gelen visualisert i Syngene™ G: Box med tilhørende Genesys G:Box chemi-XRQ software (Syngene, UK), med DNA-fragmenter som tilsvarer en lengde på rundt 1000 basepar.

PCR-produkt ble rensert med GeneJET Gel Extraction and DNA Cleanup Micro Kit, etter produsentens anvisninger (Thermo Fischer Scientific: Cat K0702). Deretter ble produktet kvantifisert ved hjelp av BioTek PowerWave XS Microplate spektrofotometer med tilhørende analyseprogram Gen 5 og micro-volum plate (260 og 280 nm). Før prøvene ble sendt til sekvensering ble 5 µl prøve med en konsentrasjon mellom 20-80 ng/µl tilsatt i et sterilt sentrifugerør, sammen med 5 µl forward-primer (338F). Prøver utenfor gitt konsentrasjon ble

fortynnet med nukleasefritt vann. Deretter ble prøvene merket med forskjellige sekvenserings-ID og sendt til sekvensering (Lightrun Sequencing, Eurofins Genomics, Tyskland). For å identifisere de amplifiserte sekvensene ble disse sammenlignet med sekvenser i NCBI sin nukleotid-database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

#### 3.4.1. Fylogenetisk analyse basert på 16S rRNA sekvenser

Sekvens-sammenligning (multiple sequence alignment) ble utført med ClustalW, innebygd i MEGA7 programvaren (Kumar, Stecher og Tamura, 2016). 16S sekvensene fra alle melkesyrebakteriene samt tilhørende referansesekvenser (basert på beste treff i NCBI nukleotid-database) ble inkludert i sammenligningen. Følgende referansesekvenser ble lastet ned fra NCBI: *Carnobacterium divergens* stamme DSM 20623 (accession nummer NR\_044706.2), *Carnobacterium gallinarum* stamme NCFB 2766 (NR\_118905.1), *Carnobacterium maltaromaticum* stamme DSM 20342 (NR\_004710.2), *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* stamme JCM 1564 (AB596937.1) og *Leuconostoc lactis* stamme KCTC 3528 (NR\_040823.1). Et fylogenetisk tre ble generert ved hjelp av Neighbour-Joining i MEGA7, og Kimura to-parameter metode ble brukt for analyse av evolusjonære avstander (Saitou og Nei, 1987). Det ble brukt 1000 bootstrap-replikater for å teste robustheten til det genererte treet. Den fylogenetiske analysen inkluderte 34 sekvenser over et kontinuerlig område på 828 nukleotider.

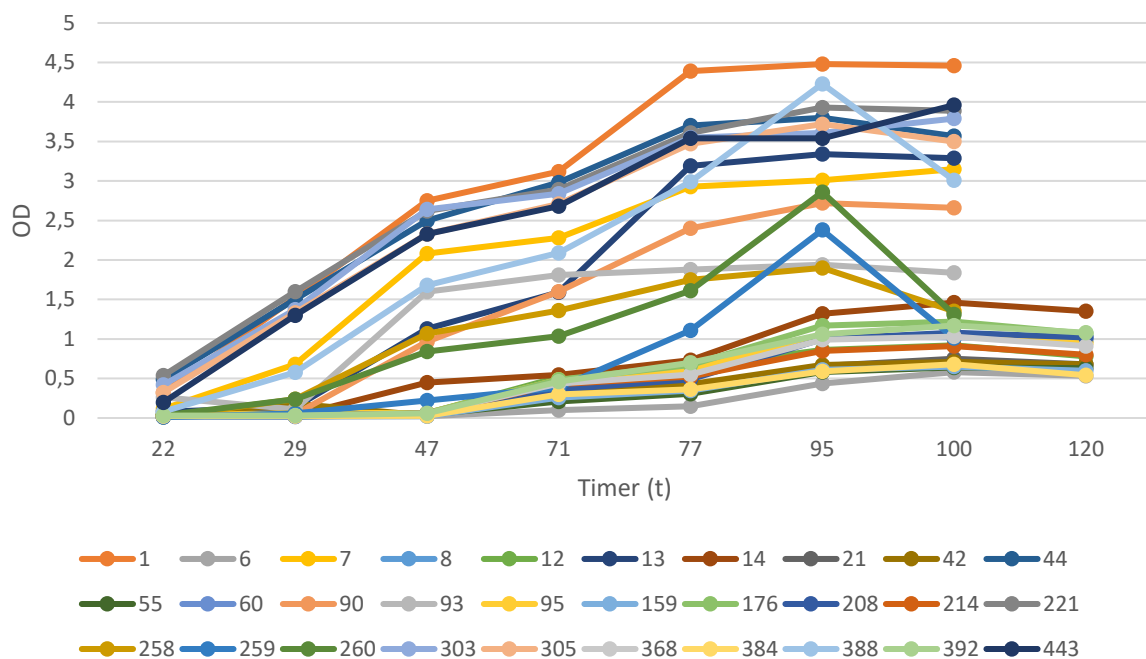
#### 3.5. Statistiske analyser

For å finne signifikante forskjeller mellom veksten av de ulike melkesyrebakteriene både alene og i co-kultur og målorganismene *L. innocua*, *E. coli* og *S. aureus*, ble log-verdiene for kimtallet lagt inn i Statistical Package for the Social Science (SPSS, versjon 25). Det ble også undersøkt etter signifikante forskjeller mellom vekst av målorganismene på selektiv agar mot BHI Agar. For å sammenligne de ulike gruppene ble det utført en enveis variansanalyse (ANOVA) etterfulgt av Tukey Test ( $p < 0,05$ ).

## 4. Resultat

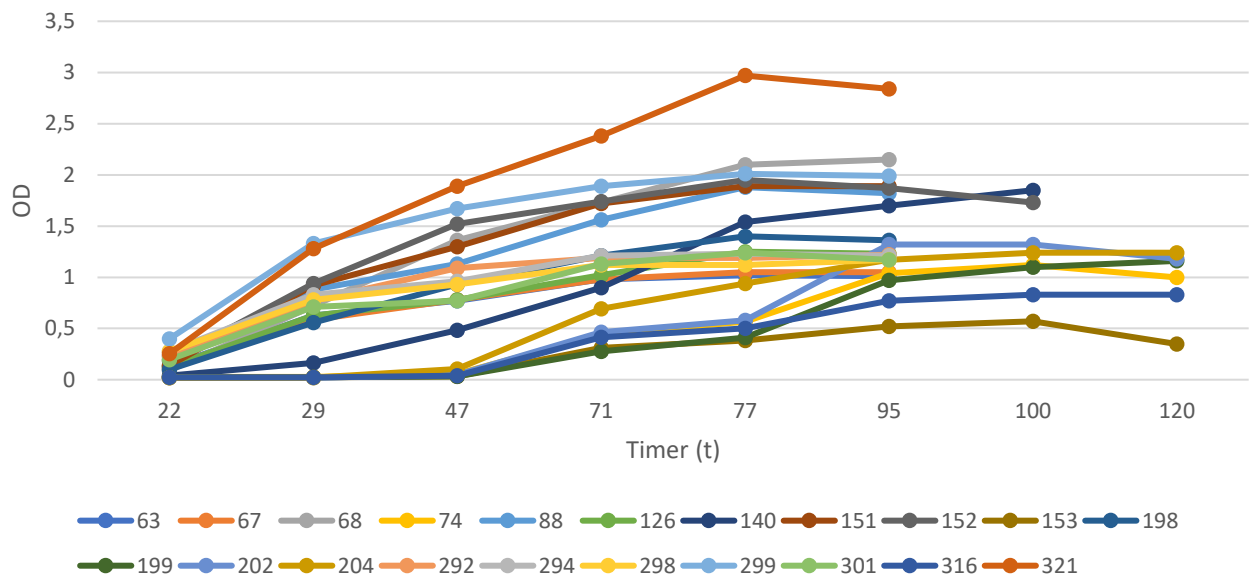
### 4.1. Vekstegenskaper ved lav temperatur

Av totalt 100 melkesyrebakterieisolater var 33 isolert fra røkelaks, 44 fra sushi og 23 fra gravlaks. Ved å undersøke vekstegenskapene til bakterieisolatene ved 15 °C kunne seks isolater (nr. 45, 189, 194, 248, 344, 452) ekskluderes, da de ikke vokste ved denne temperaturen. Bakterieisolat nr. 75 ble også ekskludert grunnet kontaminert isolat. Dermed ble vekstegenskapene til totalt 93 bakterieisolater undersøkt, hvor 30 bakterieisolater var fra røkelaks (figur 5), 41 fra sushi (figur 6 og 7) og 22 fra gravlaks (figur 8) ved hjelp av OD-målinger.



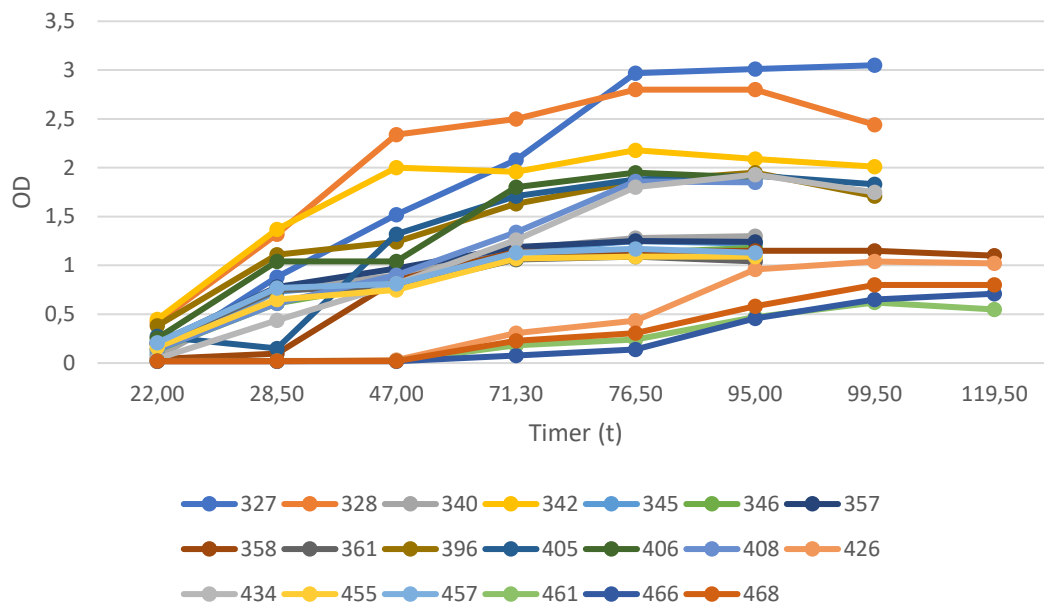
Figur 5: Vekstegenskaper ved 15 °C for melkesyrebakterieisolatene fra røkelaks. OD ble målt ved 600 nm.

Vekstegenskapene ved 15 °C for bakterieisolatene fra røkelaks vises i figur 5. En gruppe bakterieisolater (nr. 1, 44, 221, 305, 303, 443) var kommet i eksponentiell fase ved første måling av OD etter 22 timer, mens andre hadde en lagfase til i underkant av 50 timer (nr. 6, 8, 12, 21, 42, 55, 60, 95, 159, 176, 208, 214, 368, 384). Samtlige bakterieisolat nådde stasjonær fase i en periode mellom 80 og omtrent 100 timer. Ved stagnering varierte OD-verdien mellom 0,58 (bakterieisolat nr. 6) og 4,46 (bakterieisolat nr. 1).



Figur 6: Vekstegenskaper ved 15 °C for halvparten av melkesyrebakterieisolatene fra sushi (nr. 63-321). OD ble målt ved 600 nm.

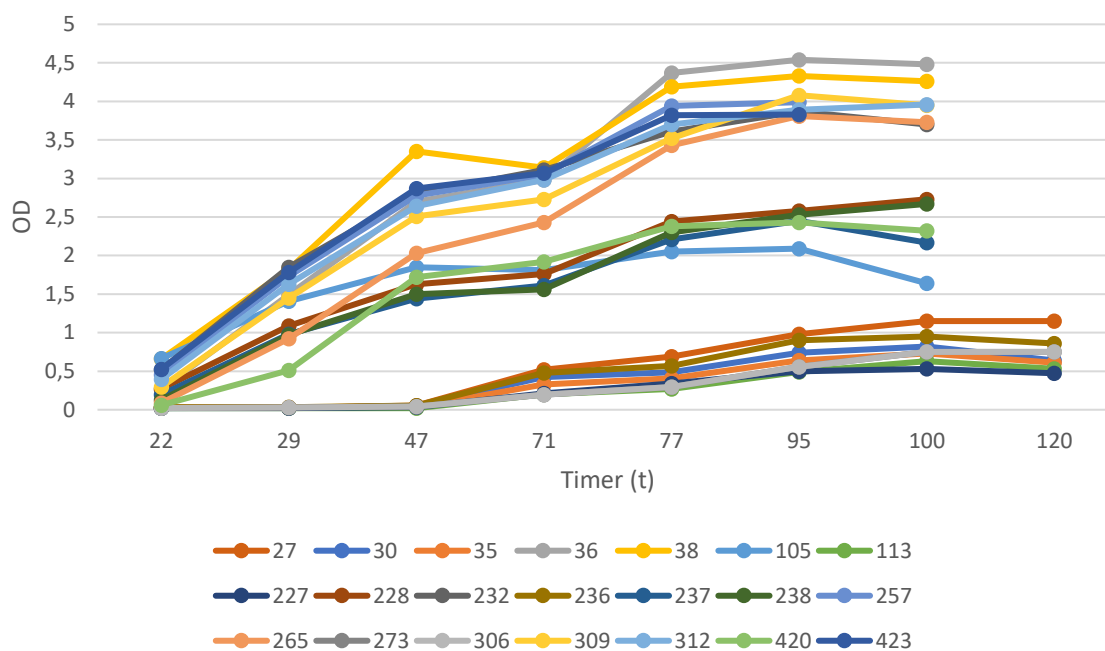
Vekstegenskapene ved 15 °C til 21 av bakterieisolatene fra sushi vises i figur 6. Etter første OD-måling etter 22 timer hadde en gruppe bakterieisolater (nr. 63, 67, 68, 88, 151, 152, 198, 292, 294, 298, 299, 301, 321) nådd eksponentiell fase, og etter omtrent 50 timer hadde samtlige bakterieisolat kommet ut av lagfasen. Etter i underkant av 77 timer nådde samme gruppe stasjonær fase, mens en annen gruppe nådde stasjonær fase etter i underkant av 100 timer (nr. 74, 153, 199, 202, 316). Ved stagnering varierte OD-verdien mellom 0,57 (bakterieisolat nr. 153) og 2,84 (bakterieisolat nr. 321).



Figur 7: Vekstegenskaper ved 15 °C for resterende av melkesyrebakterieisolatene fra sushi (nr. 327-468). OD ble målt ved 600 nm.

Vekstegenskapene ved 15 °C til resterende 20 melkesyrebakterieisolatene fra sushi vises i figur 7. Etter første OD-måling etter 22 timer hadde bakterieisolatene nådd eksponentiell fase, med unntak av nr. 358, 405, 426, 461, 466, 468 som nådde fasen etter omtrent 50 timer. Bakterieisolatet nr. 342 nådde stasjonær fase etter omtrent 47 timer, mens bakterieisolatene nr. 426, 461, 466 og 468 nådde stasjonær fase etter i underkant av 100 timer. Ved stagnering varierte OD-verdien mellom 0,550 (bakterieisolat nr. 461) og 3,05 (bakterieisolat nr. 327).



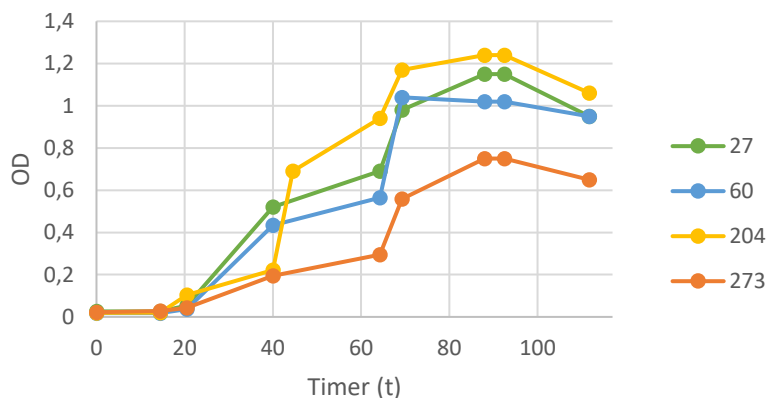


Figur 8: Vekstegenskaper ved 15 °C for melkesyrebakterieisolatene fra gravlaks. OD ble målt ved 600 nm.

Vekstegenskapene ved 15 °C for bakterieisolatene fra røkelaks vises i figur 8. De fleste bakterieisolatene var kommet i eksponentiell fase ved første måling av OD etter 22 timer, med unntak av bakterieisolat nr. 27, 30, 35, 113, 227, 236 og 273 som hadde en lagfase til i underkant av 50 timer. Bakterieisolatene nådde stasjonær fase på et tidspunkt fra omtrent 95 timer til i underkant av 120 timer. Ved stagnering varierte OD-verdien mellom 0,475 (bakterieisolat nr. 227) og 4,48 (bakterieisolat nr. 36).

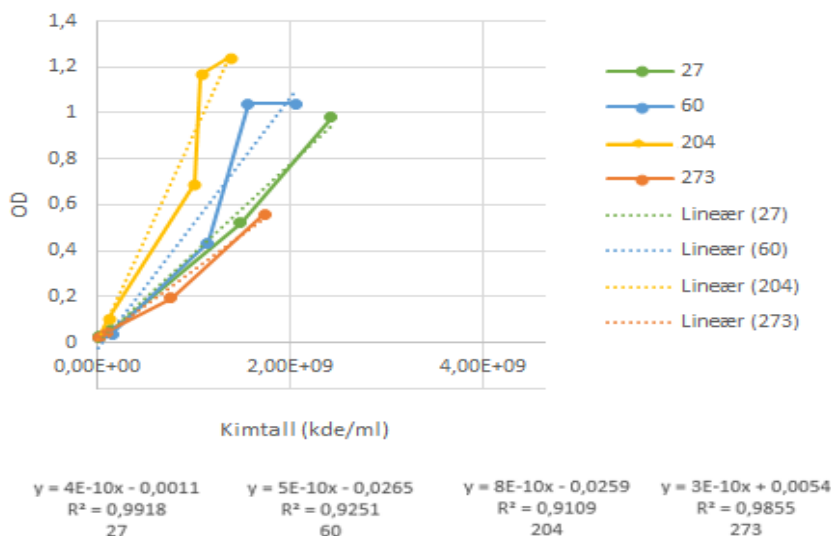
#### 4.2. Standardisering av OD mot kimtall for melkesyrebakteriene

For utvalget på 4 bakterieisolat som ble utsådd for beregning av kimtall ble disse fremstilt i en egen figur som illustrerer OD mot tid (figur 9) og OD mot kimtall (figur 10). Fordelingen hos disse bakterieisolatene var 1 bakterieisolat fra røkelaks (nr. 60), 1 fra sushi (nr. 204) siden isolatnummer 75 ble ekskludert og 2 fra gravlaks (nr. 27 og 273).



Figur 9: Vekstegenskaper ved 15 °C for de utvalgte bakterieisolatene som også ble sådd ut for beregning av kimtall. OD ble målt ved 600 nm. Bakterieisolater fra røkelaks er nr. 60, fra sushi er nr. 204 og bakterieisolat nr. 27 og 273 er isolert fra gravlaks.

Ved OD mot tid var resultatet relativt likt for samtlige av de utvalgte bakterieisolatene. Bakterieisolat nr. 273 hadde den laveste OD-verdien ved stagnering med en OD på 0,65, mens bakterieisolat nr. 204 hadde den høyeste verdien på 1,24.



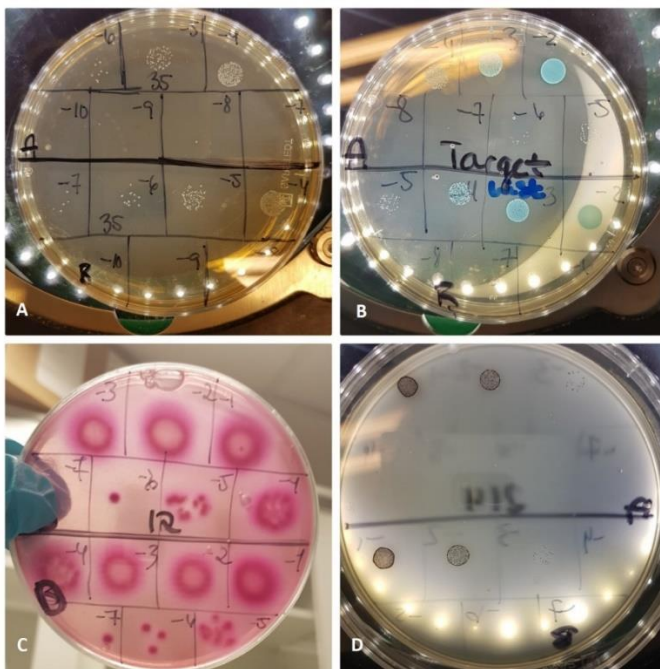
Figur 10: OD (målt ved 600 nm) mot kimtall for de utvalgte bakterieisolatene, dyrket ved 15 °C. For hvert av bakterieisolatene er ligningen for veksten inkludert.

Punktene i figur 10 viser punktene i eksponentiell fase for de utvalgte bakterieisolatene. Bakterieisolat nr. 273 hadde et endt kimtall på  $1,73 \cdot 10^9$  kde/ml og nr. 204  $1,37 \cdot 10^9$  kde/ml.

Ved å løse likningene for hvert av bakterieisolatene med konsentrasjon (x) på  $5 \cdot 10^8$  kde/ml ble OD-verdiene henholdsvis 0,20, 0,22, 0,37 og 0,16 for bakterieisolatene nr. 27, 60, 204 og 273. Dette ga en gjennomsnittlig OD-verdi på 0,24 og et valgt tillatt avvik på 10 % for fremtidige OD-målinger ( $\pm 0,02$ ).

#### 4.3. Testing av selektive medier til målorganismene ved bruk av spotting

I forkant av screeningen ble spotting av både melkesyrebakterier alene og målorganismer (*L. innocua*, *E. coli* og *S. aureus*) alene og i co-kultur, på de ulike mediene testet ut (bilde 6).

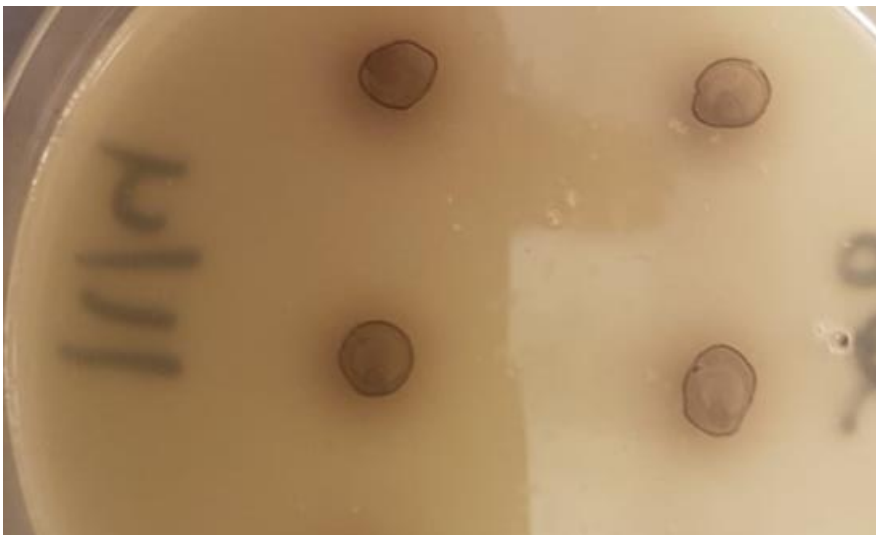


Bilde 6: Melkesyrebakterier (A), *L. innocua* på Brilliance Listeria Agar (B), *E. coli* på VRBA (C) og *S. aureus* på BPA (D) etter inkubering (foto: eget)

Som bilde 6 viser var utseendet til spottene avhengig av hvilken bakterie og agar som ble benyttet. Melkesyrebakteriene, som hadde blitt spottet på MRS Agar (bilde 6A), ble inkubert aerobt (siden de hadde hatt aerobe forhold sammen med fiskejuicen i brønnplaten). Dette viste seg å gi dårligere vekstforhold, slik at senere ble melkesyrebakteriene inkubert anaerobt. Spottingen av *L. innocua* på Brilliance Listeria Agar med supplement (bilde 6B) hadde like kimtall på BHI Agar, med henholdsvis kimtallene  $9,4 \pm 0,5$  log kde/ml og  $9,4 \pm 0,4$  log kde/ml

( $p < 0,05$ ). Brilliance *Listeria* Agar med supplement var også selektiv nok til å hindre melkesyrebakteriene i å vokse.

*E. coli* spottet på VRBA fungerte også (bilde 6C), hvor kontrollen ga like kimtall på selektiv agar ( $8,8 \pm 0,3 \log \text{kde/ml}$ ) og kontrollen på BHI Agar ( $8,5 \pm 0,7 \log \text{kde/ml}$ ) ( $p < 0,05$ ). Også VRBA var en selektiv nok agar til at melkesyrebakteriene ikke klarte å vokse her. Under spottingen av *S. aureus* på BPA med supplement (bilde 6D) var det store forskjeller på resultatet for kimtall på selektiv agar ( $5,7 \pm 1,8 \log \text{KDE/ml}$ ) mot BHI Agar ( $9,0 \pm 0,4 \log \text{kde/ml}$ ). Det ble forsøkt å benytte BPA uten tilsatt supplement, men det resulterte i et medie som ikke var selektiv nok. Ved å benytte BPA tilsatt supplement videre viste det seg at dette mediet var heller ikke selektivt nok, og melkesyrebakteriene kunne også vokse på denne agaren (bilde 7 og 8). Først ble det dannet en grå sone, deretter også enkeltkolonier.



Bilde 7: Melkesyrebakterier inkubert ved 15 °C i 1 døgn på Baird Parker Agar (foto: eget)



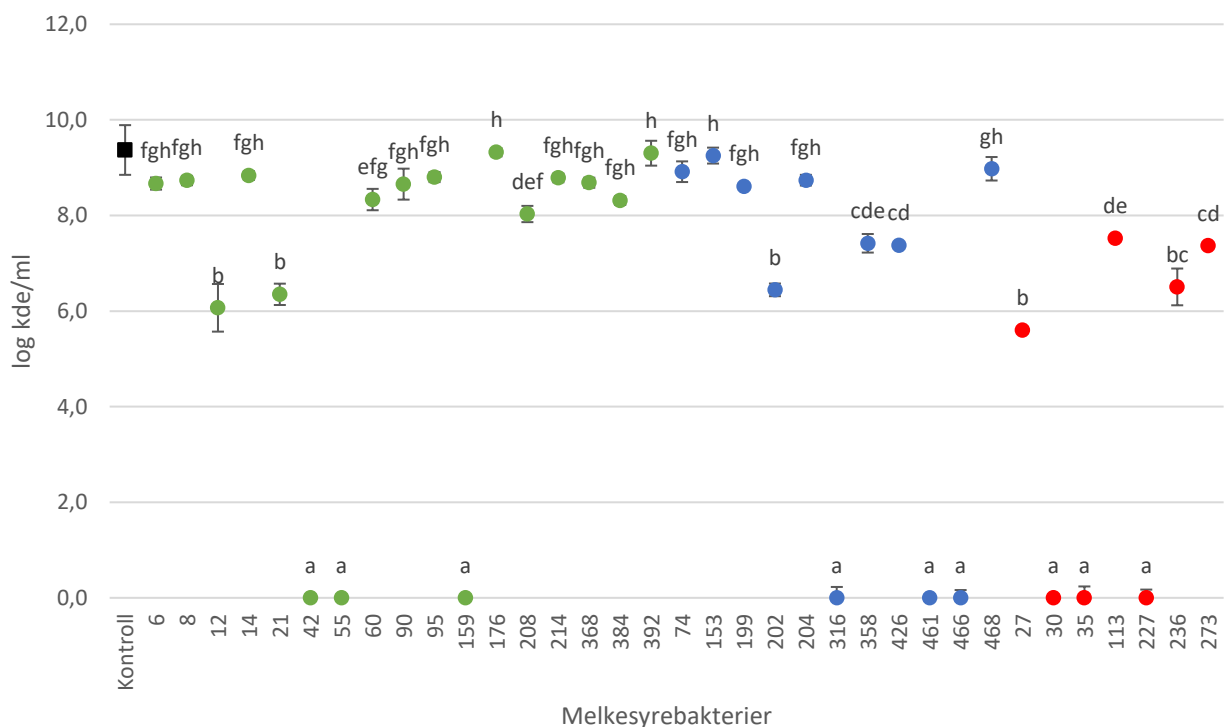
Bilde 8: Melkesyrebakterier med fortynningene  $10^1$ - $10^4$  (fra venstre mot høyre) inkubert ved 37 °C i 5 dager på Baird Parker Agar tilsatt supplement (foto: eget)

#### 4.4. Screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene

Ut fra alle melkesyrebakteriene ble det gjort et utvalg på 35 bakterieisolater for videre screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene *L. innocua*, *E. coli* og *S. aureus*. Dette utvalget besto av 17 bakterieisolater isolert fra røkelaks, 12 fra sushi og 7 fra gravlaks.

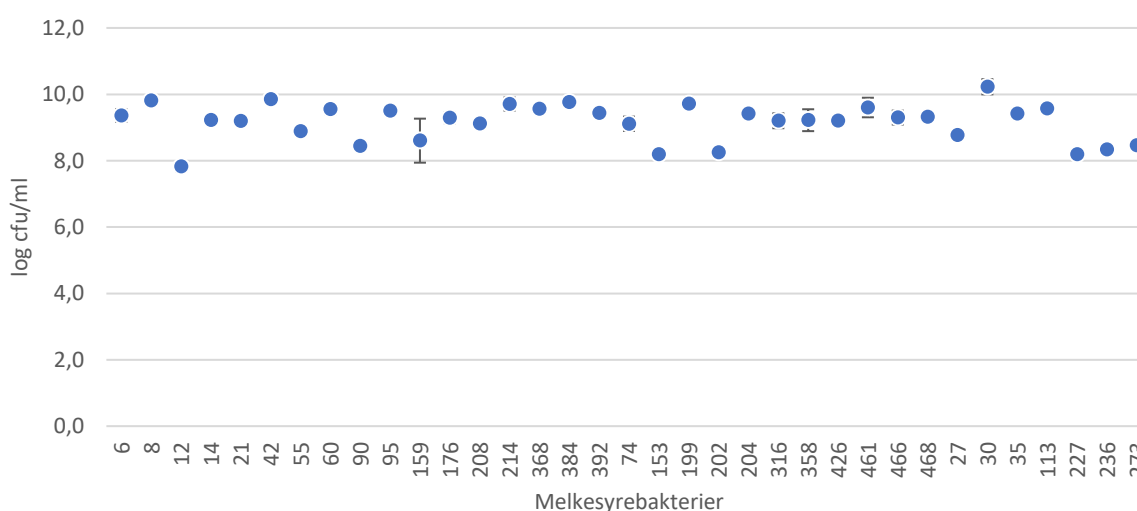
##### 4.4.1. *Listeria innocua*

De 35 melkesyrebakteriene som ble screenet for inhiberende egenskaper ble inkubert i en co-kultur med *L. innocua* i fiskejuice i en 96-brønnsplate i en periode på 96 timer. Co-kulturen ble videre spottet og kvantifisert på Brilliance *Listeria* tilsatt supplement (figur 11). Kontrollen er *L. innocua* alene (sort), uten tilsetning av melkesyrebakterier. Rekkefølgen av isolater er ut fra produktene røkelaks (nr. 6-92) (markert i grønt), sushi (nr. 74-468) (markert i blått) og gravlaks (nr. 30-273) (markert i rødt). De ulike bokstavene viser hvilke av bakterieisolatene som er signifikant like.



Figur 11: *L. innocua* oppgitt i gjennomsnittlige log-verdier med standardavvik for kimtall etter inkubering i co-kultur med melkesyrebakterier i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C, vekst på selektivt medie. Kontroll er *L. innocua* alene og markert i sort, bakterieisolat nr. 6-392 (rekkefølge fra venstre mot høyre) er isolert fra røkelaks og markert i grønt, bakterieisolat nr. 74-426 er isolert fra sushi og markert i blått, og bakterieisolat nr. 27-273 er isolert fra gravlaks og markert i rødt. De ulike bokstavene viser hvilke av bakterieisolatene som er signifikant like.

Av totalt 35 bakterieisolater ble 9 bakterieisolat (nr. 42, 55, 159, 316, 461, 466, 30, 35 og 227) fullstendig inhibert (25,7 %). Andre bakterieisolat med en god inhiberende effekt mot *L. innocua* var nr. 12, 21, 202 og 27. Bakterieisolatene nr. 6, 8, 14, 74, 90, 95, 153, 176, 199, 204, 214, 368, 392 og 468 hadde ingen inhiberende effekt. Kontrollen uten tilsatt melkesyrebakterier hadde et kimtall på  $\log 9,4 \pm 0,5$  kde/ml. Som sikkerhet for at melkesyrebakteriene alene vokste i fiskejuicen ble de spottet og kvantifisert på MRS Agar (figur 12).



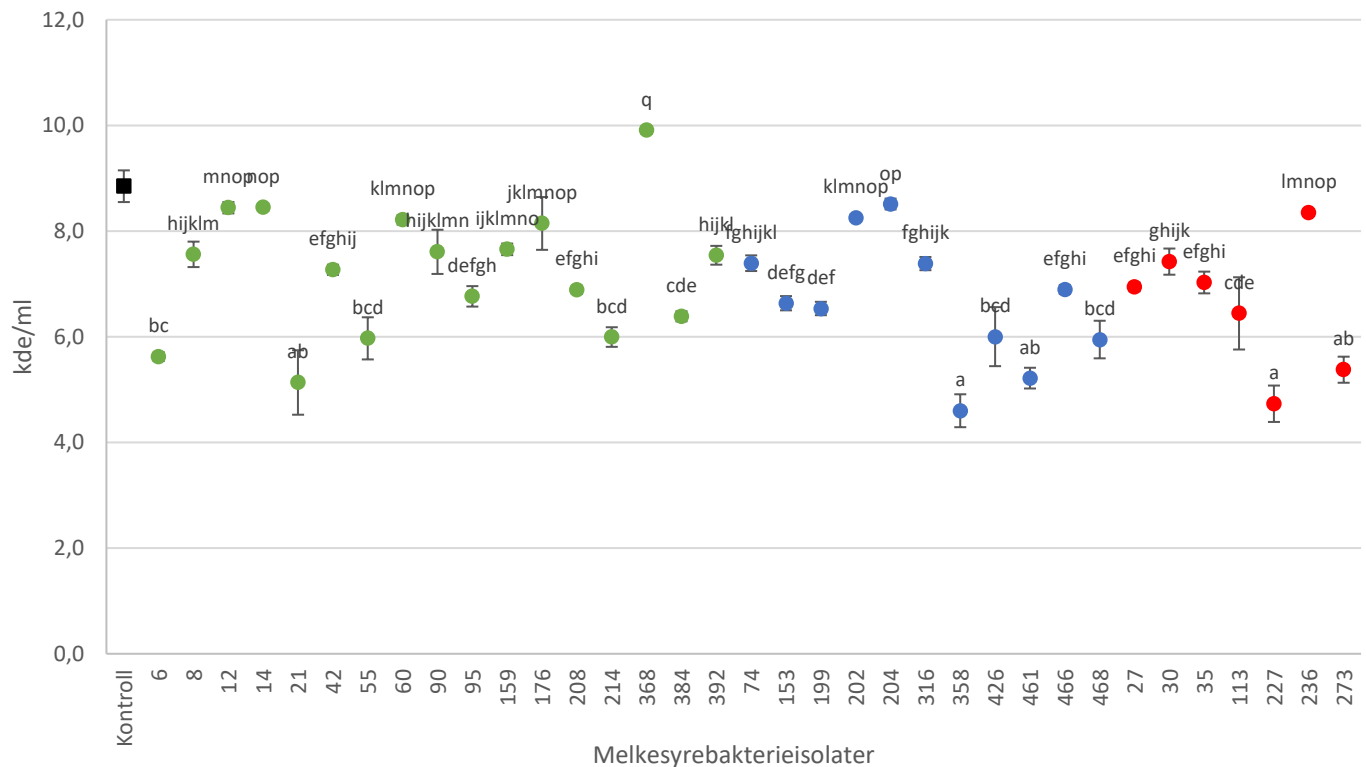
Figur 12: Melkesyrebakteriene oppgitt i gjennomsnittlige log-verdier med standardavvik for kimtall spottet på MRS Agar, etter inkubering i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C. Bakterieisolat nr. 6-392 (rekkefølge fra venstre mot høyre) er isolert fra røkelaks, bakterieisolat nr. 74-468 er isolert fra sushi og bakterieisolat nr. 27-273 er isolert fra gravlaks.

Figur 12 viser gjennomsnittlige log-verdier av samtlige melkesyrebakterier spottet på MRS Agar, etter inkubering i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C. Rekkefølgen av isolater er ut fra produktene røkelaks (nr. 6-92), sushi (nr. 74-468) og gravlaks (nr. 30-273). Samtlige isolater har vekst over  $\log 7,8$  kde/ml (nr. 12), og opp til  $\log 10,2$  kde/ml (nr. 30).

#### 4.4.2. *Escherichia coli*

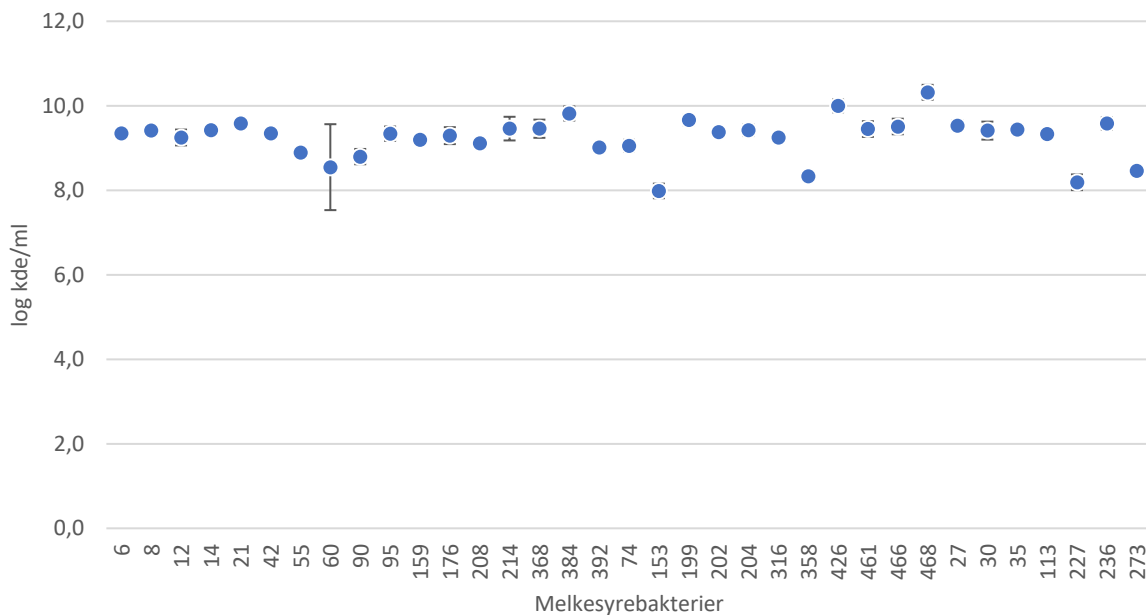
De 35 melkesyrebakteriene som ble screenet for inhiberende egenskaper ble inkubert i en co-kultur med *E. coli* i fiskejuice i en 96-brønnsplate i en periode på 96 timer. Co-kulturen ble

videre spottet og kvantifisert på VRBA (figur 13). Kontrollen er *E. coli* alene (sort), uten tilsetning av melkesyrebakterier. Rekkefølgen av isolater er ut fra produktene røkelaks (nr. 6-92) (markert i grønt), sushi (nr. 74-468) (markert i blått) og gravlaks (nr. 30-273) (markert i rødt). De ulike bokstavene viser hvilke av bakterieisolatene som er signifikant like.



Figur 13: *E. coli* oppgitt i gjennomsnittlige log-verdier med standardavvik for kimtall etter inkubering i co-kultur med melkesyrebakterier i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C, vekst på selektivt medie. Kontroll er *E. coli* alene og markert i sort, bakterieisolat nr. 6-392 (rekkefølge fra venstre mot høyre) er isolert fra røkelaks og markert i grønt, bakterieisolat nr. 74-426 er isolert fra sushi og markert i blått, og bakterieisolat nr. 27-273 er isolert fra gravlaks og markert i rødt. De ulike bokstavene viser hvilke av bakterieisolatene som er signifikant like.

Av de 35 bakterieisolatene hadde bakterieisolatene nr. 6, 21, 358, 461, 227 og 273 best inhiberende effekt (17,1 %). Bakterieisolat nr. 368 dårligst inhibering, hvor gjennomsnittlig kimtall var høyere enn hos kontrollen. Andre bakterieisolater som ikke hadde inhiberende effekt var bakterieisolat nr. 12, 14, 60, 176, 202, 204 og 236. Kontroll uten tilsatt melkesyrebakterier hadde en log-verdi på  $8,9 \pm 0,3$  kde/ml. På samme måte som ved screeningen etter inhiberende effekt av *L. innocua*, ble det også her spottet og kvantifisert melkesyrebakterier alene på MRS Agar (figur 14).



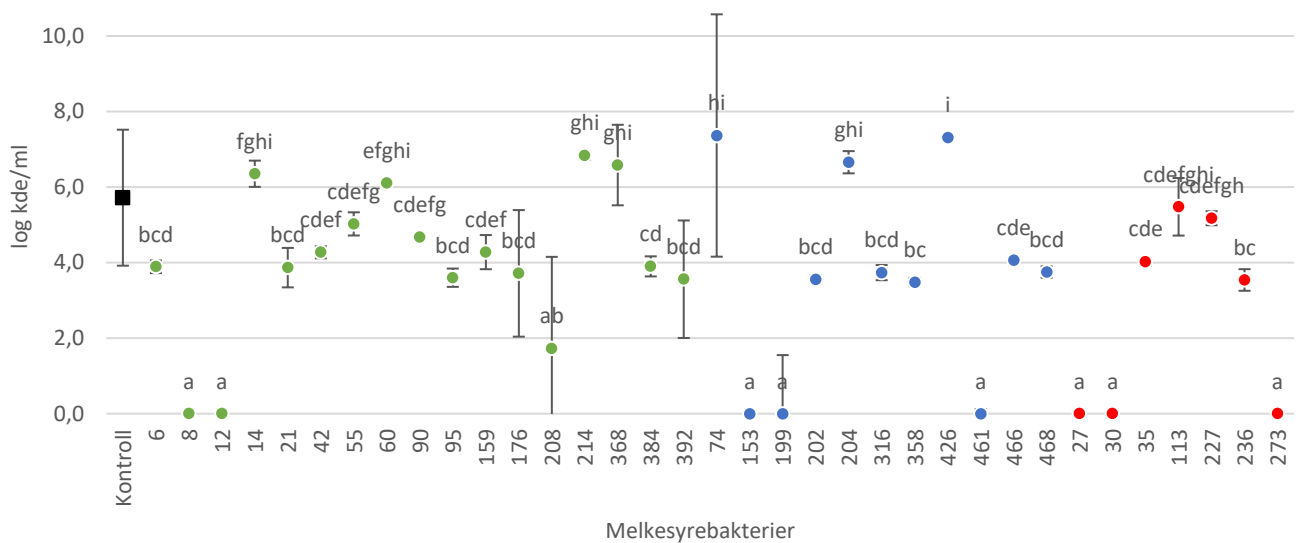
Figur 14: Melkesyrebakteriene oppgitt i gjennomsnittlige log-verdier med standardavvik spottet på MRS Agar, etter inkubering i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C. Bakterieisolat nr. 6-392 (rekkefølge fra venstre mot høyre) er isolert fra røkelaks, bakterieisolat nr. 74-468 er isolert fra sushi og bakterieisolat nr. 27-273 er isolert fra gravlaks.

Figur 14 viser gjennomsnittlige log-verdier med standardavvik av samtlige melkesyrebakterier spottet på MRS Agar, etter inkubering i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C. Rekkefølgen av isolater er ut fra produktene røkelaks (nr. 6-92), sushi (nr. 74-468) og gravlaks (nr. 30-273). Samtlige isolater hadde vekst over log 8,0 kde/ml (nr. 153), og opp til log 10,3 kde/ml (nr. 468).

#### 4.4.3. *Staphylococcus aureus*

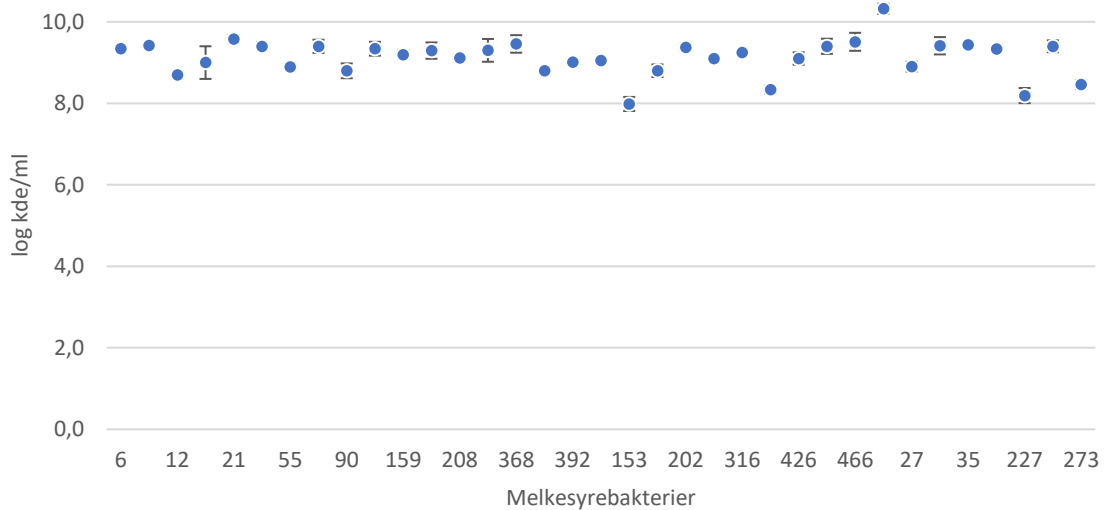
De 35 melkesyrebakteriene som ble screenet for inhiberende egenskaper ble inkubert i en co-kultur med *S. aureus* i fiskejuice i en 96-brønnsplate i en periode på 96 timer. Co-kulturen ble videre spottet og kvantifisert på BPA tilsatt supplement (figur 15). Kontrollen er *S. aureus* alene (sort), uten tilsetning av melkesyrebakterier. Rekkefølgen av isolater er ut fra produktene røkelaks (nr. 6-92) (markert i grønt), sushi (nr. 74-468) (markert i blått) og gravlaks (nr. 30-273) (markert i rødt). De ulike bokstavene viser hvilke av bakterieisolatene som er signifikant like.





Figur 15: *S. aureus* oppgitt i gjennomsnittlige log-verdier med standardavvik for kimtall etter inkubering i co-kultur med melkesyrebakterier i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C, vekst på selektivt medie. Kontroll er *S. aureus* alene og markert i sort, bakterieisolat nr. 6-392 (rekkefølge fra venstre mot høyre) er isolert fra røkelaks og markert i grønt, bakterieisolat nr. 74-426 er isolert fra sushi og markert i blått, og bakterieisolat nr. 27-273 er isolert fra gravlaks og markert i rødt. De ulike bokstavene viser hvilke av bakterieisolatene som er signifikant like.

Av totalt 35 bakterieisolater ble 8 bakterieisolat (nr. 8, 12, 27, 30, 153, 199, 273 og 461) fullstendig inhibert (22,9 %). Bakterieisolatene nr. 14, 60, 214, 368, 74, 204 og 426 hadde ikke inhiberende effekt da de hadde høyere log-verdier enn kontrollen. Andre bakterieisolater uten inhiberende effekt var bakterieisolat nr. 90, 95 og 227. Kontroll uten tilsatt fikk et kimtall på  $\log 5,7 \pm 1,8$  kof/ml. På samme måte som ved screeningen etter inhiberende effekt av *L. innocua* og *E. coli*, ble det også her spottet og kvantifisert melkesyrebakterier alene på MRS Agar (figur 16).



Figur 16: Melkesyrebakteriene oppgitt i gjennomsnittlige log-verdier med standardavvik for kimtall spottet på MRS Agar, etter inkubering i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C. Bakterieisolat nr. 6-392 (rekkefølge fra venstre mot høyre) er isolert fra røkelaks, bakterieisolat nr. 74-468 er isolert fra sushi og bakterieisolat nr. 27-273 er isolert fra gravlaks.

Figur 16 viser gjennomsnittlige log-verdier med standardavvik av samtlige melkesyrebakterier spottet på MRS Agar, etter inkubering i 96-brønnsplate i 96 timer ved 15 °C. Rekkefølgen av isolater er ut fra produktene røkelaks (nr. 6-92), sushi (nr. 74-468) og gravlaks (nr. 30-273). Samtlige isolater hadde vekst over log 8,0 (nr. 153), og opp til log 10,3 (nr. 468).

#### 4.4.4. Melkesyrebakteriene mot målorganismene

Alle melkesyrebakteriene ble sammenlignet mot alle målorganismene for å se om isolatene hadde effekt mot flere av målorganismene, eventuelt forskjell mellom inhibering mot grampositive (*L. innocua* og *S. aureus*) og gramnegative bakterier (*E. coli*), og forskjeller blant de ulike produsentene av produktene røkelaks, sushi og gravlaks (tabell 3).

Tabell 3: Vekst oppgitt i log-verdier for de ulike målorganismene alene (kontroll) og i co-kultur sammen med melkesyrebakterier, inkubering i fiskejuice i 96 timer ved 15 °C. Rød farge indikerer ingen inhibering, med <1,0 log reduksjon fra kontrollen. Gul farge indikerer medium inhibering mellom 1,0-3,0 log reduksjon fra kontrollen. Grønn farge indikerer isolat med god inhiberende effekt og >3,0 log reduksjon fra kontrollen. Tall markert i rødt har en gjennomsnittlig log-verdi høyere enn kontrollen.

Isolatnr.	Produkt	Produsent	<i>L. innocua</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
6	Røkelaks	E	8,7	5,6	3,9
8	Røkelaks	H	8,7	7,6	<2,3
12	Røkelaks	H	6,1	8,4	<2,3
14	Røkelaks	H	8,8	8,5	6,4
21	Røkelaks	H	6,4	5,1	3,9
27	Gravlaks	E	5,6	7,0	<2,3
30	Gravlaks	E	<2,3	7,4	<2,3
35	Gravlaks	E	<2,3	7,0	4,0
42	Røkelaks	D	<2,3	7,3	4,3
55	Røkelaks	D	<2,3	6,0	5,0
60	Røkelaks	E	8,3	8,2	6,1
74	Sushi	B	8,9	7,4	7,4
90	Røkelaks	F	8,7	7,6	4,7
95	Røkelaks	F	8,8	6,8	3,6
113	Gravlaks	D	7,5	6,4	5,5
153	Sushi	A	9,3	6,6	<2,3
159	Røkelaks	F	<2,3	7,7	4,3
176	Røkelaks	E	9,3	8,1	3,7
199	Sushi	A	8,6	6,5	<2,3
202	Sushi	A	6,4	8,3	3,6
204	Sushi	A	8,7	8,5	6,6
208	Røkelaks	E	8,0	6,9	1,7
214	Røkelaks	F	8,8	6,0	6,8
227	Gravlaks	D	<2,3	4,7	5,2
236	Gravlaks	D	6,5	8,4	3,5
273	Gravlaks	F	7,4	5,4	<2,3

316	Sushi	B	<2,3	7,4	3,7
358	Sushi	C	7,4	4,6	3,5
368	Røkelaks	F	8,7	9,9	6,6
384	Røkelaks	E	8,3	6,4	3,9
392	Røkelaks	E	9,3	7,5	3,6
426	Sushi	A	7,4	6,0	7,3
461	Sushi	C	<2,3	5,2	<2,3
466	Sushi	A	<2,3	6,9	4,0
468	Sushi	A	9,0	6,0	3,8
Kontroll			9,4	8,9	5,7

De ulike fargekodene i tabell 3 indikerer grad av inhiberende effekt: rød farge tilsvarer ingen inhibering med mindre enn 1,0 log reduksjon fra kontrollen av gitt målorganisme, gul farge indikerer medium inhiberende effekt mellom 1,0 og 3,0 log reduksjon fra kontrollen av gitt målorganisme, mens grønn farge indikerer god inhibering og mer enn 3,0 log inhibering fra kontrollen av gitt målorganisme. De røde tallene indikerer en gjennomsnittlig log-verdi høyere enn kontrollen.

Totalt hadde 19 av 35 bakterieisolater (54,3 %) inhiberende effekt mot minimum en av målorganismene, og 8 av 35 bakterieisolater (22,9%) inhiberende effekt mot flere enn en målorganisme. Den beste kandidaten til videre screeninger for bruk i biokonservering av sjømat er bakterieisolat nr. 461, som har god inhiberende effekt på alle tre målorganismene. Andre gode kandidater er bakterieisolat nr. 12, 27 og 30, med spesielt hensyn på grampositive bakterier. Bakterieisolat nr. 6 har vist seg å være god effekt på gramnegative bakterier (men ingen eller middels inhiberende effekt på grampositive bakterier). Bakterieisolat nr. 199 har vist god inhiberende effekt på både *E. coli* og *S. aureus*, men ingen inhiberende effekt på *L. innocua*. Kandidater som har gitt dårlige resultat under denne screeningen med ingen inhiberende effekt på noen av målorganismene er bakterieisolat nr. 204 og 368.

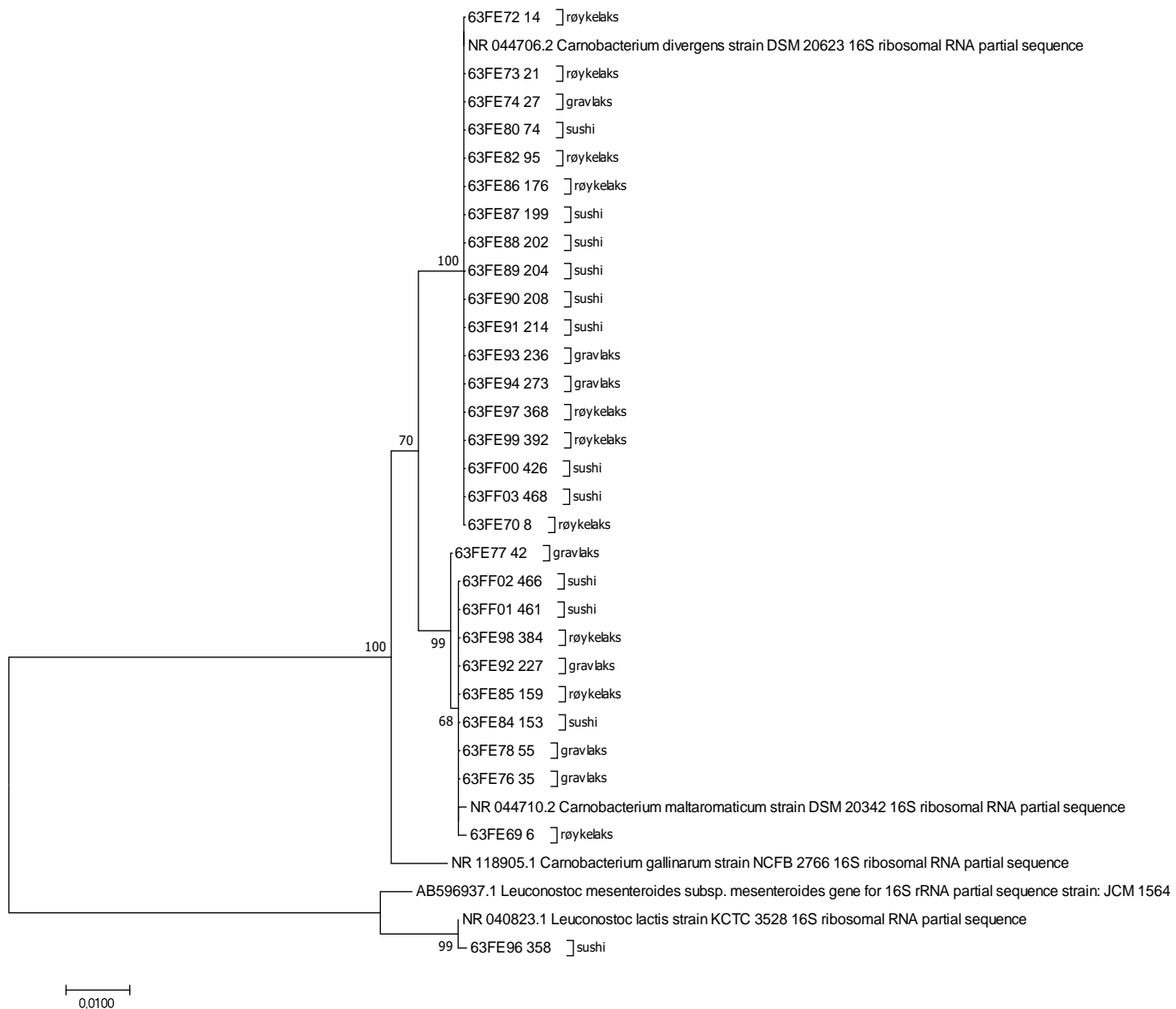
Med unntak av produsent G ble alle produsentene av produktene røkelaks, sushi og gravlaks representert i denne screeningen. For røkelaks fra produsent D hadde 2 bakterieisolater inhiberende effekt, produsent E hadde 2 bakterieisolater med inhiberende effekt og 5 isolater fra produsent H hadde inhiberende effekt. Alle produsentene fra sushi hadde bakterieisolater med inhiberende effekter, hvorav produsent A hadde 5 bakterieisolater med inhiberende effekt, produsent B hadde 1 bakterieisolat med inhiberende effekt og produsent C hadde 4 bakterieisolater med inhiberende effekt. Hos gravlaks hadde isolater fra 3 av 5 produsenter vist inhiberende effekter for målorganismene, hvor 2 bakterieisolater fra produsent D hadde inhiberende effekter, 5 bakterieisolater fra produsent E hadde inhiberende effekter og 2 bakterieisolater fra produsent F.

#### 4.5. Identifisering av melkesyrebakterier

Etter PCR ble bakterieisolatene detektert på 1 % agarosegel, hvor samtlige isolat ga tydelige bånd i brønnene og negativkontrollen var negativ. Før sekvensering ble prøvene kvantifisert, for å undersøke at de hadde en DNA-konsentrasjon mellom 20-80 ng/μl og A260/A280-ratio mellom 1,8 og 2,0, som indikerer rene PCR-produkter med god kvalitet (vedlegg 2). Bakterieisolater med en DNA-konsentrasjon høyere enn 80 ng/μl ble fortynnet 1:1 med nukleasefritt vann. Dette var bakterieisolat 21, 27, 30, 35, 55, 74, 204, 316, 426. Siden bakterieisolatene nr. 8, 95, 199 og 201 hadde verdier tett i underkant av 80 ng/μl og ble også disse bakterieisolatene fortynnet. Samtlige bakterieisolater hadde renhetstall mellom 1,8-2,0.

Av totalt 35 bakterieisolater var det 30 stykker med høy nok kvalitet på DNA til å kunne identifiseres. Resterende bakterieisolat (nr. 12, 30, 60, 90 og 316) fikk ikke sekvenseringsresultat. Av alle identifiseringene ble totalt 29 isolater identifisert som *Carnobacterium* sp. og et bakterieisolat ble identifisert som *Leuconostoc* sp. Samtlige bakterieisolater ble identifisert med minimum 99,5 % sannsynlighet for riktig identifisering og en E-verdi på 0,0. For røkt laks ble det identifisert 14 *Carnobacterium* sp. og 3 manglet sekvenseringsresultat (vedlegg 3 tabell 3). For sushi ble det identifisert 9 *Carnobacterium* sp., 1 *Leuconostoc* sp. (bakterieisolat 358) og et manglet sekvenseringsresultat (bakterieisolat nr. 316) (vedlegg 3 tabell 4). Samtlige bakterieisolater fra gravlaks ble identifisert som

*Carnobacterium*, med unntak av et bakterieisolat (nr. 30) som ikke fikk identifikasjon (vedlegg 3 tabell 5).



Figur 17: «Neighbour Joining» tre basert på 16S rRNA sekvensene fra melkesyre bakterier isolert fra røykelaks, sushi og gravlaks. Referansesekvensene ble hentet fra NCBI Nucleotid Database. Prosent av 1000 bootstrap-replikater er vist ved forgreiningene og kun verdier > 50 % er vist. Skalaen indikerer en evolusjonsmessig avstand på 0,01 nukleotid-substitusjoner per posisjon. Analysen inkluderte 34 sekvenser over et kontinuerlig strekk på 828 nukleotider.

Isolatene grupperte seg med de utvalgte referansesekvensene i tre hovedklynger (figur 17).

En klynge inkluderte isolater fra røykelaks, sushi, gravlaks og referansesekvensen til *C.*

*divergens*. Den andre hovedklyngen inkluderte isolater fra røykelaks, sushi, gravlaks og

referansesekvensen til *C. maltaromaticum*. Ingen av isolatene grupperte seg med

referansesekvensen til *C. gallinarum* selv om mange av treffene i nukletotid-databasen indikerte likhet med denne arten.

## 5. Diskusjon

### 5.1. Vekstegenskaper ved lav temperatur

Av totalt 100 melkesyrebakterier isolert fra spiseferdig sjømat vokste 93 bakterieisolater ved 15 °C. For at et bakterieisolat skal kunne være aktuelt for biokonservering av kjølelagrede sjømatprodukter kreves det at de vokser ved lavere temperatur og må dermed testes under relevante betingelser (Singh, 2018). Bakterieisolatene som ikke vokste ved 15 °C ble dermed ekskludert. Matamoros *et al.* undersøkte 132 bakterieisolater isolert fra diverse sjømatprodukter, hvorav 54 isolater kunne vokse ved 15 °C og resterende ble ekskludert (Matamoros *et al.*, 2009b). Selv om bakterieisolatet ikke vokser kan det likevel tenkes at det produserer antimikrobielle metabolitter (Jaroni og Brashears, 2000; Amézquita og Brashears, 2002).

Av de 93 bakterieisolater som det ble undersøkt vekstegenskapene hos (ved hjelp av OD-målinger) var 30 bakterieisolater fra røkelaks, 41 isolater fra sushi og 22 isolater fra gravlaks. Resultatene derfra viste seg å være svært varierende (figur 5-8), både med hensyn til OD-verdien de oppnår og tiden det tar før stasjonær fase inntreffer. Veksten hos de ulike bakterieisolatene kan begrenses, noen i større grad enn andre, av for eksempel faktorer som produksjon av organiske syrer (hovedsakelig melkesyre, men også eddiksyre i noen tilfeller) samt begrensninger på næringsstoffer. Organiske syrer kan ha en toksisk og antimikrobiell effekt, selv på produsenten (de Wit og Rombouts, 1990). Siden det ble målt OD to ganger i døgnet vil det kun indikere omtrentlig når de ulike vekstfasene inntreffer. Likevel anses det som tilstrekkelig antall målepunkter for å gi en indikasjon på vekstegenskapene hos de ulike bakterieisolatene.

## 5.2. Standardisering av OD mot kimtall for melkesyrebakterier og målorganismer

Det var ønskelig å undersøke forholdet mellom OD og kimtall for melkesyrebakteriene, for å videre basere cellekonsentrasjonen i inokulumet på OD-målinger. For å ha reproducerbare forhold mellom de ulike forsøksoppsettene var det viktig å oppnå et visst forholdstall mellom melkesyrebakterier og målorganismer, før brønnplateoppsettene. Det vil ikke nødvendigvis være behov for å vite eksakt konsentrasjon, så lenge forholdet mellom målorganisme og tilsatt melkesyrebakterie var konstant. Forsøk på standardisering ble gjort kun for et utvalg, med antakelsen at de fleste av bakterieisolatene ville ha like vekstegenskaper. De fire utvalgte melkesyrebakterieisolatene (figur 9) hadde tilsynelatende like veksthastigheter og ble ansett som representative for de stammene som ble inkludert i screeningen, i tillegg til at de representerte alle tre produktene. I dette prosjektet var det ingen kjennskaper omkring melkesyrebakterieisolatene fra før, annet enn produktene de var isolert fra og at de vokste opp på MRS Agar ved 25 °C. Bakterieisolater som ble benyttet i andre screening-studier ble valgt ut med bakgrunn fra tidligere prosjekter, slik at det var generelt mer kunnskap om isolatene fra start (Leroi *et al.*, 2015; Matamoros *et al.*, 2009a; Wiernasz *et al.*, 2017).

Totalt sett varierte veksten (veksthastighet, lagfase og OD når stasjonær fase inntraff) hos alle bakterieisolatene i mye større grad enn først antatt. For en mer nøyaktig og representativ OD-verdi, som også ville dekket vekstegenskapene for flere av bakterieisolatene ser en i ettertid at det var behov for å undersøke forholdet mellom OD og kimtall for flere bakterieisolater enn bare 4 stykker. Det ble likevel beregnet en OD-verdi som ble brukt til å standardisere startkonsentrasjonen (ca.  $10^8$  kde/ml) til melkesyrebakteriene i brønnplateforsøkene. Bakterieisolatene brukte imidlertid ulik tid på å nå denne OD-verdien ( $0,24 \pm 0,02$ ). Av den grunn kunne det være vanskelig å beregne tidspunkt for at OD-verdien skulle være høy nok til at melkesyrebakteriene kunne videre inkuberes i brønnplate. I ettertid kan en tenke at det burde vært brukt mer tid på denne standardiseringen med tanke på optimalisering av metode, slik at den kunne blitt brukt videre i andre prosjekter. Det kan også være vanskelig å sammenligne metoden med andre studier som har screenet etter inhiberende effekter, siden det ikke ser ut til at de har gjort forarbeidet ved å standardisere vekstegenskaper (Saraoui *et al.*, 2017; Sung-Mee og Dong-Soon, 2009; Tamang *et al.*, 2005; Wiernasz *et al.*, 2017).



Matamoros *et al.* målte OD etter 48 timer og etter en uke, uten å utdype dette noe mer (Matamoros *et al.*, 2009b).

I et annet pågående prosjekt ble de samme bakterieisolatene benyttet (nr. 27, 60, 90, 204, 273 og 152), og samme prosedyre for standardisering av OD mot kimtall ble benyttet. Resultatet var tilnærmet likt som resultatet i denne oppgaven. Dette kan tyde på at forholdet mellom OD og kimtall stemmer overens for flere av bakterieisolatene (upubliserte data). Selv om tiden varierer før de ulike bakterieisolatene når gitt OD-verdi ( $0,24 \pm 0,02$ ), indikerer resultatene at det er et brukbart forholdstall mellom OD og kimtall. Det finnes også verktøy i form av nettbaserte kalkulatorer for å beregne forholdet mellom OD og kimtall. For å sammenligne det eksperimentelt oppnådde forholdstallet med etablerte forholdstall for *E. coli* ble en slik kalkulator benyttet. Ifølge kalkulatoren er en OD-verdi på 0,24 tilsvarende  $1,92 \cdot 10^8$  kde/ml (*Bacterial cell number (OD600)*, u.å.). Dette samsvarer med den ønskede konsentrasjonen på  $10^8$  kde/ml. På grunn av varierende forhold mellom OD og kimtall for målorganismene (resultater ikke vist) ble denne kalkulatoren benyttet for målorganismene.

### 5.3. Testing av selektive medier til målorganismene ved bruk av spotting

Spotting er en enkel, effektiv og ressursbesparende metode for å estimere kimtall (Thomas *et al.*, 2015). Metoden vil spare antall agarskåler benyttet, sammenlignet med tradisjonell utstryksmetode, ved å ha flere fortyninger på samme agarskål (Strahsburger *et al.*, 2016). Dermed vil en få kvantifisert et stort antall prøver på kort tid. Deteksjonsgrensen vil heller ikke endres sammenlignet med vanlig utstryksmetode, og i dette tilfellet var grensen  $< 2,3$  log kde/ml (Sieuwerts *et al.*, 2008; Wiernasz *et al.*, 2017). Spotter med over 50 kolonier ble angitt som overgrodd (Wiernasz *et al.*, 2017), og dette viste seg å være greit å kvantifisere for de ulike agarene som ble benyttet i denne oppgaven.

Spottingen av melkesyrebakterier på MRS Agar, *L. innocua* på Brilliance *Listeria* Agar tilsatt supplement, *L. innocua* og *S. aureus* på BHI Agar fungerte optimalt og uten problemer. Det var for eksempel ingen problemer ved at koloniene fløt utover og i hverandre, dette også etter

den gitte inkuberingstiden. Kontrollen av *L. innocua* på selektiv agar mot BHI Agar fungerte også godt, og det var ikke signifikante forskjeller mellom kimtallene, henholdsvis  $9,4 \pm 0,5$  log kde/ml og  $9,4 \pm 0,4$  log kde/ml ( $p < 0,05$ ). Melkesyrebakteriene vokste frem etter omtrent 5 døgn og *L. innocua* varierte mellom 1-2 døgn. Ifølge Thomas *et al.* var det ikke nødvendig å tørke skålene før spotting (Thomas *et al.*, 2015). I dette forsøket ble det likevel valgt å tørke skålene ( $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  i én time) for å hindre utflytning av spottene. Det ble erfart at ved spotting av *E. coli* på VRBA var det helt essensielt at agarskålene var tørre nok før spotting, hvis ikke ville spottene flyte utover og i hverandre. Dette viser det at tørketid og tørking generelt vil variere ut fra agar (Sieuwerds *et al.*, 2008; Thomas *et al.*, 2015). En annen utfordring ved spotting av *E. coli* var inkuberingstiden, som ikke måtte være for lang før prøvene ble kvantifisert. En inkuberingstid mellom 18-24 timer fungerte bra, men burde ikke overskride dette for å unngå at koloniene vokste sammen. På BHI Agar kunne det være vanskelig å skille mellom koloniene av *E. coli*, da også disse hadde en tendens til å vokse over i hverandre. Likevel var det greit med noe å sammenligne målorganismen spottet på selektiv agar med. Kimtallene for kontrollene av *E. coli* endte opp med like kimtall på  $8,8 \pm 0,3$  log kde/ml på selektiv agar og  $8,5 \pm 0,7$  log kde/ml på BHI Agar ( $p < 0,05$ ).

Spottingen av *S. aureus* på Baird Parker Agar ga mange utfordringer. For det første var det litt utfordrende å bestemme inkuberingstid før kvantifisering, og av den grunn ble ulike avlesningstider testet. Det var nødvendig å inkubere en viss tid for å få synlige kolonier og ved første kvantifisering ble mest sannsynlig spottene forsøkt kvantifisert litt for tidlig (omtrent 18 timer). Ikke før etter omtrent et døgn kom koloniene tydeligere frem. For å undersøke om kvantifiseringen ble lettere ble det forsøkt å benytte Baird Parker Agar uten tilsatt supplement, siden supplementet (som inneholder eggeplomme) gjorde agaren uklar. Resultatet herfra gjorde at mediet ikke ble selektivt nok og de typiske svarte koloniene var ikke lengre svarte. Dette skyldes at supplementet er tilsatt telluritt, og uten denne tilsetningen vil ikke *S. aureus* omdanne telluritt til tellurium, som er det som gir de sorte koloniene (Niskanen og Aalto, 1978). Mange av spottene med melkesyrebakterier i co-kultur med *S. aureus* bar også preg av en grå sone. Dette så ikke ut til å være tilfellet hos kontrollen med *S. aureus* alene, og dermed ga dette mistanke om at også melkesyrebakteriene kunne vokse på denne selektive agaren. Vekstegenskapene hos melkesyrebakteriene ble undersøkt, og det

viste seg at de først danner en grå sone (bilde 7), for så å danne enkeltkolonier på BPA (bilde 8). Av den grunn var det svært vanskelig å avgjøre hvilke bakterier som hadde vokst opp, melkesyrebakterier eller *S. aureus*. Det var tilsynelatende to typer kolonier som vokste opp, store svarte og små svarte. Det kan tenkes at den ene typen kolonier vil være melkesyrebakterier og den andre *S. aureus*, men det ble likevel erfart at kontrollen med *S. aureus* hadde begge typene kolonier. Mediet som velges vil kunne påvirke resultatene (Leroi *et al.*, 2015), noe det ser ut gjort her i stor grad. Det var betydelig forskjell i veksten av *S. aureus* på selektiv agar ( $5,7 \pm 1,8$  log kde/ml) mot vekst på BHI Agar ( $9,0 \pm 0,4$  log kde/ml). Dette indikerer at *S. aureus* hadde bedre vekstforhold på BHI Agar. Stressede celler som er subletalt skadde vil vise lavere eller underestimere populasjonen når de blir spottet på et selektivt medie, kontra et generelt. Stressede celler kan skyldes temperatursenkningen (Montville og Matthews, 2013, s. 9).

Totalt sett er det flere momenter som tyder på at spotting på BPA ikke var en optimal metode, og det skulle vært vurdert å endre den selektive agar for *S. aureus* på et tidligere tidspunkt. Et selektivt medie for *S. aureus* baserer seg på flere faktorer som salttoleranse, produksjon av hemotoksin, evne til å aerobt omdanne telluritt til tellurium, produksjon av gule pigment, fermentering av mannitol og reaksjoner omkring eggeplomme. Til tross for alle disse faktorene vil ingen, enten alene eller i kombinasjon, kunne garantere for fullstendig selektivitet (Niskanen og Aalto, 1978). Ilbäck undersøkte vekst på Baird Parker Agar for tre ulike blandingskulturer, hvor resultatet viste til flere falsk positive prøver i de ulike kulturene. Den ene blandingskulturen hadde 5 falsk positive prøver, hvorav melkesyrebakterien *L. plantarum* var en av mikroorganismene i kulturen (Ilbäck, 2017, s. 14). Selv om melkesyrebakterier ikke ble undersøkt alene indikerer dette likevel at selektiviteten på agaren ikke nødvendigvis er god nok. I tilfellet under denne oppgaven ser det ikke ut til å virke selektivt nok med hensyn til melkesyrebakteriene, samtidig som at vekstforholdene ikke er særlig gode med hensyn til lavere kimtall på selektiv agar kontra på BHI Agar. Andre selektive agar for målorganismen som kunne vært forsøkt å benytte er Aureus ChromoSelect Agar og Azide Blood Agar (Sigma Aldrich, u.å.).

#### 5.4. Screening etter inhiberende egenskaper mot målorganismene

Screening etter inhiberende effekter hos målorganismene *L. innocua*, *E. coli* og *S. aureus* ble utført ved bruk av beriket fiskejuice som medie tilsatt i 96-brønnsplater. Deretter ble det tilsatt en co-kultur av melkesyrebakterier og målorganisme, og inkubert i 96 timer ved 15 °C. Denne metoden gir en kjapp, men presis sammenligning av inhiberende effekter av co-kultur mot kontrollen (Wiernasz *et al.*, 2017). Av totalt 100 bakterieisolater ble 35 isolater screenet etter inhiberende effekter. Utvalget ble basert på bakterieisolater med like vekstegenskaper. Samtlige melkesyrebakterieisolater oppnådde et høyt kimtall ved dyrking i fiskejuice i brønnplater (mellom  $6,13 \cdot 10^7$  og  $2 \cdot 10^{10}$  kde/ml) (figur 12, 14 og 16). Andre studier har basert utvalget på morfologi, gassproduksjon fra glukose, veksttemperatur og fermentering av karbohydrater (Pilet *et al.*, 1995), og feno- og genotypiske analyser (Brillet *et al.*, 2004). Alle resultatene i screeningen er basert på gjennomsnitt av fire paralleller. Standardavvikene viser at det er liten variasjon mellom parallellene i hver gruppe (figur 11, 13), med unntak for *S. aureus* (figur 15). Som kontroll ble både målorganisme alene og melkesyrebakterie alene i hvert prøveoppsett under screeningen. For målorganismene ble det oppnådd på følgende kimtall;  $2,5 \cdot 10^9$  kde/ml (*L. innocua*),  $6,3 \cdot 10^8$  kde/ml (*E. coli*) og  $5,0 \cdot 10^5$  kde/ml (*S. aureus*). I et sammenlignbart forsøk ble det oppnådd en konsentrasjon på  $1,3 \cdot 10^8$  kde/ml for *L. monocytogenes* tilsatt med tilsvarende startkonsentrasjon som i denne oppgaven (Wiernasz *et al.*, 2017). Det laveste oppnådde kimtallet for melkesyrebakteriene var  $6,3 \cdot 10^7$  kde/ml. Dette viser at observerte inhiberende effekter ikke skyldes fravær av verken målorganisme eller melkesyrebakterier, der det er fullstendig eller ingen inhiberende effekt. Saraoui *et al.* målte konsentrasjoner på melkesyrebakteriene *L. piscium* og *C. divergens* på henholdsvis  $10^8$  og  $10^9$  kde/g etter en uke (Saraoui *et al.*, 2017).

Grad av inhiberende effekter ble delt inn i tre grupper, hvor en god inhiberende effekt av målorgansime ble definert som en reduksjon på mer enn 3,0 log kde/ml, medium inhiberende effekt ble definert som en reduksjon mellom 1,0-3,0 log kde/ml og ingen inhiberende effekt ble definert som en reduksjon på mindre enn 1,0 log kde/ml reduksjon. Disse verdiene hadde utgangspunkt i Wiernasz *et al.*, som beskriver en reduksjon på 4,0-4,5 log kde/ml som sterk inhiberende effekt (Wiernasz *et al.*, 2017).

I screeningene etter inhibering av *L. innocua* hadde 13 av 35 melkesyrebakterieisolater god inhiberende effekt (37,1 %) (figur 11). Av disse hadde 9 bakterieisolater fullstendig inhiberende effekt og en reduksjon på minimum 7,1 log kde/ml. For å bekrefte resultatene hos de med fullstendig inhiberende effekt ble screeningene gjentatt med samme resultat. Melkesyrebakteriene som ble screenet i denne oppgaven hadde en høyere andel av bakterieisolater med inhiberende effekter enn andre studier. Amézquita og Brashears screenet 49 melkesyrebakteriestammer isolert fra spiseferdige kjøttprodukter, hvor de 3 mest inhiberende stammene hadde en reduksjon på log 3,5. Co-kulturen med melkesyrebakterier og *L. monocytogenes* ble inkubert ved 5 °C og lagringsforløpet gikk over 28 dager (Amézquita og Brashears, 2002). Av de 52 stammene som ble screenet for inhiberende effekt av *L. monocytogenes* viste alle stammene en liten inhibering (Matamoros *et al.*, 2009b).

I screeningene etter inhibering av *E. coli* hadde 6 av 35 melkesyrebakterieisolater (17,1 %) god inhiberende effekt (figur 13), med en reduksjon mellom log 3,3 og log 4,3. Bakterieisolat nr. 368 hadde høyere kimtall enn kontrollen for screening etter inhibering av *E. coli*. Dette forsøket skulle vært gjentatt for å sjekke om det var en synergistisk effekt eller om det hadde skjedd en feil. Sannsynligheten for sistnevnte er stor, med tanke på de små volumene som benyttes så ville ikke en eventuell feil ha syntes. Under screeningene etter inhiberende effekter av flere ulike målorganismer, utført av Wiernasz *et al.*, var også noen av resultatene der høyere for målorganisme i co-kultur sammenlignet med kontrollen (Wiernasz *et al.*, 2017).

I screeningene etter inhibering av *S. aureus* hadde 8 av 35 melkesyrebakterieisolater fullstendig inhibering (figur 15) (22,9 %), dette tilsvarer en reduksjon på minimum 3,4 log kde/ml. Forsøkene med disse bakterieisolatene, samt bakterieisolatene som hadde høyere kimtall enn kontrollen burde vært gjentatt. Samtidig var det så mange usikre momenter i henhold til metoden for kvantifisering av *S. aureus* slik den ble utført, at i første omgang så bør prioriteringen ligge ved at metoden må optimaliseres. Resultatene må dermed tolkes med forsiktighet for inhiberende effekt av *S. aureus*. Likevel vil en få et forholdstall hvor kontrollen har høyere kimtall enn hos kimtall for melkesyrebakterier i co-kultur. Screeningene bør likevel etterprøves.

Totalt hadde 19 av 35 bakterieisolater (54,3 %) inhiberende effekt mot minimum en av målorganismene, og 8 av 35 bakterieisolater (22,9%) inhiberende effekt mot flere enn en målorganisme. Som eneste bakterieisolat viste nr. 461 seg for å ha god inhiberende effekt mot alle tre målorganismene, som også viser til en bred inhibering av både grampositive og gramnegative bakterier. Wiernasz screenet totalt 35 bakterieisolater fra produktene kaldrøkt laks, fersk laks, makrell, brosme og reker, hvor samtlige hadde inhiberende effekter. Ved videre screeninger ble 6 stammer av melkesyrebakterier valgt ut som biokonserverende stammer, til bruk i laks- og torskereprodukter (Wiernasz *et al.*, 2017).

Melkesyrebakteriene i screeningen var isolert fra produkter av røkelaks, sushi og gravlaks fra flere produsenter (A-G), og med unntak av produsent G for røkelaks var alle produsentene representert i utvalget. For røkelaks fra produsent D hadde 2 bakterieisolater inhiberende effekt, produsent E hadde 2 bakterieisolater med inhiberende effekt og 5 isolater fra produsent H hadde inhiberende effekt. Alle produsentene fra sushi hadde bakterieisolater med inhiberende effekter, hvorav produsent A hadde 5 bakterieisolater med inhiberende effekt, produsent B hadde 1 bakterieisolat med inhiberende effekt og produsent C hadde 4 bakterieisolater med inhiberende effekt. Hos gravlaks hadde isolater fra 3 av 5 produsenter vist inhiberende effekter for målorganismene, hvor 2 bakterieisolater fra produsent D hadde inhiberende effekter, 5 bakterieisolater fra produsent E hadde inhiberende effekter og 2 bakterieisolater fra produsent F. Ut fra dette ser det ut til at produsent H av røkelaks, produsent A fra sushi og produsent E av røkelaks er de produsentene som har bakterieisolater med flest inhiberende effekter, av de bakterieisolatene som har blitt screenet hittil.

Det melkesyrebakterieisolatet som virket mest lovende blant de som ble screenet var bakterieisolat nr. 461. Dette bakterieisolatet er også det eneste med god inhiberende effekt mot alle tre målorganismene, og dermed kan det tyde på at det virker inhiberende mot både grampositive og gramnegative bakterier. Bakterieisolat nr. 273 ser også ut til å ha en bred inhibering av både grampositive- og gramnegative bakterier. Den har god inhiberende effekt på både *E. coli* og *S. aureus*, men kun middels effekt på *L. innocua*. Siden metoden for *S. aureus*

ikke fungerer optimalt og bakterieisolatet vokser i co-kultur på Baird Parker Agar kan det være at den kun har god inhiberende effekt på *E. coli*. Dermed kan det være at resultatet ser ut til å være bredere enn det nødvendigvis er.

Bakterieisolat nr. 6 har god inhiberende effekt på gramnegative bakterier. Generelt sett er bakteriosinproduserende melkesyrebakterier mer effektive på grampositive bakterier kontra gramnegative. Likevel har en rekke studier lyktes med å inhibere den gramnegative bakterien *E. coli* (Brashears, Reilly og Gilliland, 1998; Nigam *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2005; Sparo *et al.*, 2013). Inhiberingen kan skyldes at noen celler har blitt skadd under for eksempel senkningen i temperatur. Andre inhiberende effekter som virker inhiberende på gramnegative bakterier er produksjon av organiske syrer, diacetyl og hydrogenperoksid. Sistnevnte vil være med på å øke permeabiliteten i membranen til cellen, slik at bakteriosiner lettere kan trenge inn (Singh, 2018).

Til slutt bør det nevnes at dette kun var første screening, i en prosess som involverer mange tester for å finne isolater som kan benyttes til uttesting av biokonserverende effekter i sjømatprodukter. Videre må det utføres flere tester mot ulike miljøfaktorer og prosesseringsbetingelser, hvor de som er mest aktuell blir tatt med videre (Leroi *et al.*, 2015; Rodgers, 2001). Det bør nevnes at et melkesyrebakterieisolat kan være aktuell selv om den ikke inhiberer alle målorganismene, og god inhiberende effekt på én av målorganismene er også bra. Eksempler på videre screeninger som vil være aktuelle er å senke temperaturen ytterligere og ned til kjøleskaptemperatur, undersøke forringelsespotensialet, hvordan bakterieisolatene vil påvirke sensorisk matproduktet de skal tilsettes i, samt undersøke om bakterieisolatene har evnen til å inhibere flere målorganismer. Bakterieisolat nr. 14, 204 og 368 hadde ingen inhiberende effekt mot noen av målorganismene, og bakterieisolat nr. 60, 74, 90, 95, 113, 176, 208, 214, 236384, 426 hadde enten medium eller ingen inhiberende mot målorganismene som ble benyttet i denne oppgave. Disse ville dermed vært gode kandidater for å undersøke inhiberende effekter av andre målorganismer, og bør nok ikke tas med i videre screeninger i forbindelse med inhibering av *L. innocua*, *E. coli* og *S. aureus*. Videre arbeid vil

også omhandle å screene de resterende 58 bakterieisolatene, som ikke ble screenet i dette prosjektet.

#### 5.5. Identifisering av melkesyrebakteriene

Isolatene som ble benyttet til screening hadde ukjent identitet før screeningen startet, men ble likevel valgt å undersøke for inhiberende egenskaper. Videre var det ønsket å identifisere de ulike bakterieisolatene, for å se hvilke arter de var, og om det var stor variasjon mellom artene og variasjon mellom arter identifisert fra de ulike produktene. Det ble benyttet 16S rRNA som genetisk markør. Fordelen ved bruk av denne markøren er at den er universell, siden den finnes i alle bakterier (Janda og Abbott, 2007; Madigan *et al.*, 2012, s. 485). 16S rRNA inneholder ni hypervariable regioner, som demonstrerer diversitet mellom ulike bakteriearter og kan brukes for identifikasjon av slekter eller arter (Van de Peer, Chapelle og De Wachter, 1996). De ulike regionene vil ha ulik grad av mangfoldet i sekvensene til ulike arter, som betyr at ingen regioner vil kunne være i stand til å skille mellom alle bakterier (Chakravorty *et al.*, 2007). Dette betyr at valg av regioner som ble amplifisert (V3-V4) vil kunne påvirke resultatet. Saraoui *et al.* brukte også primere som amplifiserte V3-regionen, med en identifikasjon på slektsnivå (Saraoui *et al.*, 2017). Balcazar *et al.* benyttet primere som amplifiserer V1-V2, som egner seg for å skille mellom nært beslektede arter av melkesyrebakterier (Balcazar *et al.*, 2007).

Resultatene fra kvantifiseringen viste at DNA-et i alle prøvene var av god kvalitet, da A260/A280-ratio lå innenfor tilfredsstillende område med verdier mellom 1,8 og 2,0 (vedlegg 2) (Scientific, u.å.). Likevel var det 5 prøver som ikke fikk sekvenseringsresultat, til tross for det ble isolert DNA, som både hadde god DNA-kvantitet og -kvalitet. Av den grunn er det ingenting som tilsier at det skal være problemer med isolatene. For isolatene som ble sekvensert ble 29 isolater identifisert som *Carnobacterium* sp. og 1 identifisert som *Leuconostoc* sp (vedlegg 3). At forekomsten av *Carnobacterium* er så høy samsvarer med at *Carnobacterium* er en melkesyrebakterieslekt som ofte blir funnet i kjølte sjømatprodukter, da den vokser ned til 0 °C, både i vakuump- og i modifisert atmosfærepakkede produkter og ved tilstedeværelse av andre konserveringsmidler (Hammes og Hertel, 2006, s. 379; Pilet og Leroi, 2010, s. 7).



*Carnobacterium* dominerte også av melkesyrebakteriene tilstede (101/155) i kaldrøkt laks. Etter 2 ukers lagringstid ved 8 °C var også *L. farciminis*, *L. sakei* og *L. alimentarius* tilstede (Leroi *et al.*, 1998). Dette kan forklare hvorfor forekomsten også er så høy hos produktene røkelaks, sushi og gravlaks. Denne høye forekomsten av kun én slekt, kan også skyldes at det ble screenet bakterieisolater med relativt lik vekst. Ved screeninger av resterende bakterieisolater, med mer ulik vekst kan det tenkes at også det ville vært større variasjoner i arter. Tidligere er det identifisert arter av *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* og *Weisella* i røkelaks og gravet ørret (Leroi *et al.*, 1998; Matamoros *et al.*, 2009b; Truelstrup Hansen og Huss, 1998; Paludan-Müller *et al.*, 1998; González-Rodríguez *et al.*, 2002; Lyhs, Korkeala og Björkroth, 2002). Av fire ulike stammer ble *Leuconostoc gelidium* ansett som den beste stammen bruk til biokonservering i reker, hvor de andre stammene var *Lactococcus piscium*, *Lactobacillus fuchuensis* og *C. alterfunditum* (Matamoros *et al.*, 2009a). Sushi er et komplekst produkt, slik at en skulle trodd at det var større variasjoner enn ett isolat av *Leuconostoc* sp. og resterende isolater tilhørende *Carnobacterium* sp. (vedlegg 3 tabell 3). Hoel *et al.* identifiserte melkesyrebakteriene *Weisella* sp., *Enterococcus* sp., *Carnobacterium* sp. og *Lactobacillus* sp. i sushi ved hjelp av kulturuavhengig metode. *Lactobacillus* sp. ble kun identifisert fra sushi lagret ved 20 °C, mens de andre melkesyrebakteriene ble identifisert fra lavere temperaturer (Hoel, Jakobsen og Vadstein, 2017). Den fylogenetiske analysen av de oppnådde 16S rRNA sekvensene som også inkluderte referansesekvenser viste at melkesyrebakteriene grupperte seg i tre hovedgrupper i det fylogenetiske treet. Bootstrapping bekreftet treet's robusthet da de oppnådde verdiene var > 68 % for de tre hovedgruppene. Analysen basert på de oppnådde sekvensene indikerer at melkesyrebakteriene tilhører artene *C. divergens*, *C. maltaromaticum* og *L. lactis*. For en sikrere identifikasjon på artsnivå ville det være interessant å også sekvensere V1-V2 regionen for disse isolatene (Balcazar *et al.*, 2007).

*Carnobacterium* produserer blant annet bakteriosinet carnobacteriosin som hovedsakelig er aktiv mot *L. monocytogenes*, i tillegg til andre melkesyrebakterier (Calo-Mata *et al.*, 2008). Ut fra resultatene stemmer også dette da *L. innocua* er den målorganismen som ble inhibert av flest melkesyrebakterier, sammenlignet med de andre målorganismene. *Carnobacterium* produserer også acetat som *L. monocytogenes* er sensitiv mot (Nilsson *et al.*, 2005). Det kan

tenkes at også *L. innocua* er sensitiv mot acetat, og dette kan være en av årsakene til at melkesyrebakteriene har god inhiberende effekt og så mange som 9 bakterieisolat ble fullstendig inhibert på Brilliance *Listeria* Agar tilsatt supplement. En annen inhiberende komponent er diacetyl, som produseres av melkesyrebakterier ved tilstedeværelse av oksygen. Den antimikrobielle aktiviteten virker gjennom oksidativ skade på proteiner og som tidligere nevnt så øker den permeabiliteten i cellemembranen (Singh, 2018). I tillegg fungerer melkesyrebakterier som gode konkurrenter og kan dermed hindre veksten hos andre bakterier (Kao og Frazier, 1966).

Til tross for at 29 av 30 bakterieisolater ble identifisert som *Carnobacterium* sp., ser det ut til å ligge store variasjoner med hensyn til inhiberende effekt innad i arten. Med hensyn til de bakterieisolatene som ikke fikk identifikasjon, viste nr. 12, 30 og 316 seg til å virke spesielt lovende. Disse bør det jobbes videre med for å få identifisert dem.

Selv om *Carnobacterium* kan ha inhiberende effekter mot målorganismer bør forringelsesstatusen tas hensyn til. Denne har variert ut fra ulike studier og er fremdeles under diskusjon (Groth Laursen *et al.*, 2005). *C. maltaromaticum* ble ansett som den bakteriearten med størst forringelsespotensiale i et forsøk gjort på både torsk- og laksejuice. I forsøket produserte *C. maltaromaticum* en del lukter som ikke er typiske for sjømat, eksempelvis lukt av «skarpe føtter» og banan. Likevel var nivået av forringelse innenfor en akseptabel grense (Wiernasz *et al.*, 2017). *C. divergens* har også blitt ansett som en svak forringer (Leroi *et al.*, 2015). Selv om tidligere studier har vist varierende resultat må det likevel undersøkes for *Carnobacterium*-stammene benyttet i denne oppgaven, i tillegg til de produktene det skal tilsettes i (Leroi, 2010). Stammer av *Leuconostoc gelidium* har hindret to ulike batcher i å forringe reker. Det ble heller ikke lagt merke til endringer i den sensoriske kvaliteten etter en uke (Matamoros *et al.*, 2009a).

## 6. Konklusjon

Totalt 93 av 100 melkesyrebakterieisolater fra de spiseferdige, kjølelagrede sjømatproduktene røkelaks, sushi og gravlaks vokste opp ved 15 °C i MRS-buljong. Av utvalget på 35 melkesyrebakterieisolater som ble screenet viste hadde 13 bakterieisolater en god inhiberende effekt (>3,0 log reduksjon i kimtall sammenlignet med om målorganismen vokser alene) mot *L. innocua* (37,1 %), 6 bakterieisolater en god inhiberende effekt mot *E. coli* (17,1 %) og 8 isolater fullstendig inhibering av *S. aureus* (22,9 %). Disse melkesyrebakterieisolatene vil dermed være aktuelle for videre screeninger, med et langsiktig mål om å benytte i biokonservering av sjømat. Totalt hadde 19 melkesyrebakterieisolater (54,3 %) inhiberende effekt mot minimum en av målorganismene, og 8 melkesyrebakterieisolater (22,9%) en inhiberende effekt mot flere enn en målorganisme. Som eneste bakterieisolat hadde nr. 461 god inhiberende effekt mot alle tre målorganismene, og bakterieisolat nr. 14, 204 og 368 hadde ingen inhiberende effekt. Gjennom en del utprøving til kvantifiseringsmetoden (spotting) som ble benyttet i forbindelse med screeningen, ble det tilegnet ny kunnskap. Metodene for spotting av *L. innocua*, *E. coli* og melkesyrebakterier fungerte optimalt, men det var mer problemer omkring spotting av *S. aureus* og metoden vil kreve mer utprøvinger for å optimaliseres. Av 35 bakterieisolater ble 29 isolater identifisert som *Carnobacterium* sp., 1 *Leuconostoc* sp. (isolert fra sushi) og 5 prøver som ikke fikk sekvenseringsresultat. Dette viste til lite variasjon i både slekter og forskjeller mellom produktene, men stor variasjon innad i slekten *Carnobacterium* spp. i henhold til inhiberende effekt. Totalt 19 av 35 melkesyrebakterieisolater har vist god inhiberende effekt mot minimum en målorganisme, og disse vil være aktuelle for videre screeninger.

## 7. Referanser

- Amézquita, A. og Brashears, M. (2002) Competitive Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat Meat Products by Lactic Acid Bacteria, 65, s. 316-325. doi: 10.4315/0362-028X-65.2.316.
- Ananou, S. *et al.* (2019) *Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods.*
- Aycicek, H., Cakiroglu, S. og Stevenson, T. H. (2005) Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey, *Food Control*, 16(6), s. 531-534. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.04.005>.
- Bacterial cell number (OD600)* (u.å.). Tilgjengelig fra: <http://www.labtools.us/bacterial-cell-number-od600/>.
- Balcazar, J. *et al.* (2007) Sequencing of variable regions of the 16S rRNA gene for identification of lactic acid bacteria isolated from the intestinal microbiota of healthy salmonids, 30, s. 111-118. doi: 10.1016/j.cimid.2006.12.001.
- Balciunas, E. M. *et al.* (2013) Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review, *Food Control*, 32(1), s. 134-142. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.11.025>.
- Ben Embarek, P. K., Jeppesen, V. F. og Huss, H. H. (1994) Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from sous-vide cooked fish fillets, *Food Microbiology*, 11(6), s. 525-536. doi: <https://doi.org/10.1006/fmic.1994.1060>.
- Brashears, M. M., Reilly, S. S. og Gilliland, S. E. (1998) Antagonistic Action of Cells of *Lactobacillus lactis* toward *Escherichia coli* O157:H7 on Refrigerated Raw Chicken Meat, *Journal of Food Protection*, 61(2), s. 166-170. doi: 10.4315/0362-028x-61.2.166.
- Brillet, A. *et al.* (2004) Biodiversity of *Listeria monocytogenes* sensitivity to bacteriocin-producing *Carnobacterium* strains and application in sterile cold-smoked salmon, *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), s. 1029-1037. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02383.x.
- Buchanan, R. L. *et al.* (2017) A review of *Listeria monocytogenes*: An update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments, *Food Control*, 75, s. 1-13. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>.
- Buchrieser, C. *et al.* (2003) Comparison of the genome sequences of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*: clues for evolution and pathogenicity, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 35(3), s. 207-213. doi: doi:10.1016/S0928-8244(02)00448-0.
- Calo-Mata, P. *et al.* (2008) Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Products, *Food and Bioprocess Technology*, 1(1), s. 43-63. doi: 10.1007/s11947-007-0021-2.
- Castro, M. P. *et al.* (2011) Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: Characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production, *Meat Science*, 87(4), s. 321-329. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2010.11.006>.
- Chakravorty, S. *et al.* (2007) A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria, *Journal of Microbiological Methods*, 69(2), s. 330-339. doi: 10.1016/j.mimet.2007.02.005.
- Cintas, L. M. *et al.* (1998) Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria, *Food Microbiology*, 15(3), s. 289-298. doi: <https://doi.org/10.1006/fmic.1997.0160>.

- Cleveland, J. *et al.* (2001) Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation, *International Journal of Food Microbiology*, 71(1), s. 1-20. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00560-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00560-8).
- Costa, R. (2013) Escherichia coli in seafood: A brief overview, *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 4, s. 450-454. doi: 10.4236/abb.2013.43A060.
- Crandall, A. D., Winkowski, K. og Montville, T. J. (1994) Inability of *Pediococcus pentosaceus* to Inhibit *Clostridium botulinum* in sous vide Beef With Gravy at 4 and 10°C, *Journal of Food Protection*, 57(2), s. 104-107. doi: 10.4315/0362-028x-57.2.104.
- De Muynck, C. *et al.* (2004) Potential of selected lactic acid bacteria to produce food compatible antifungal metabolites, *Microbiological Research*, 159(4), s. 339-346. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.07.002>.
- de Wit, J. C. og Rombouts, F. M. (1990) Antimicrobial activity of sodium lactate, *Food Microbiology*, 7(2), s. 113-120. doi: [https://doi.org/10.1016/0740-0020\(90\)90017-C](https://doi.org/10.1016/0740-0020(90)90017-C).
- Deegan, L. H. *et al.* (2006) Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension, *International Dairy Journal*, 16(9), s. 1058-1071. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.026>.
- Drikkevannsforskriften (2017) *Forskrift om vannforsyning og drikkevann*. Tilgjengelig fra: [https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2016-12-22-1868/KAPITTEL\\_1#KAPITTEL\\_1](https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2016-12-22-1868/KAPITTEL_1#KAPITTEL_1) (Hentet: 19.04.2019).
- Eijsink, V. G. H. *et al.* (1998) Comparative Studies of Class IIa Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), s. 3275-3281. Tilgjengelig fra: <https://aem.asm.org/content/aem/64/9/3275.full.pdf>.
- Elbashir, S. *et al.* (2018) Seafood pathogens and information on antimicrobial resistance: A review, *Food Microbiology*, 70, s. 85-93. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.09.011>.
- Ertas Onmaz, N. *et al.* (2015) Occurrence and antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp. in retail fish samples in Turkey, *Marine Pollution Bulletin*, 90(1), s. 242-246. doi: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.046>.
- Fall, P. A. *et al.* (2010) Protective Effect of a Non-Bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 Strain Against *Listeria monocytogenes* in Sterilized Tropical Cooked Peeled Shrimp, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 19(2), s. 84-92. doi: 10.1080/10498850.2010.486910.
- FAO og WHO (2011) *Risk Assessment of Vibrio Parahaemolyticus in Seafood: Interpretative Summary and Technical Report*. ( Microbiological Risk Assessment Series 16). Rome, Italy. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/3/a-i2225e.pdf> (Hentet: 23.04.19).
- FAO (2016) *The State of World Fisheries and Aquaculture 2016: Contributing to Food Security and Nutrition for all*. (\*). Rome: FAO. Tilgjengelig fra: <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf> (Hentet: 19.04.19).
- FEHD (2000) *Risk assessment studies report No. 2 microbiological hazards evaluation for Sushi and Sashimi in Hong Kong*. Hong Kong. Tilgjengelig fra: [https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme\\_haccp/programme\\_haccp\\_ss\\_ras2.html#](https://www.cfs.gov.hk/english/programme/programme_haccp/programme_haccp_ss_ras2.html#) (Hentet: 23.04.19).
- Gálvez, A. *et al.* (2007) Bacteriocin-based strategies for food biopreservation, *International Journal of Food Microbiology*, 120(1), s. 51-70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.06.001>.

- García, P. *et al.* (2010) Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins, *Trends in Food Science & Technology*, 21(8), s. 373-382. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.010>.
- Ghanbari, M. *et al.* (2013) Seafood biopreservation by lactic acid bacteria – A review, *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), s. 315-324. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.039>.
- Giraffa, G. (2012) Selection and design of lactic acid bacteria probiotic cultures, *Engineering in Life Sciences*, 12(4), s. 391-398. doi: 10.1002/elsc.201100118.
- González-Rodríguez, M. a.-N. *et al.* (2002) Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish at the retail level, *International Journal of Food Microbiology*, 77(1), s. 161-168. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00048-X).
- Gray, J. A. *et al.* (2018) Novel Biocontrol Methods for *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Production Facilities, *Frontiers in Microbiology*, 9(605). doi: 10.3389/fmicb.2018.00605.
- Groth Laursen, B. *et al.* (2005) *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization, *Systematic and Applied Microbiology*, 28(2), s. 151-164. doi: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2004.12.001>.
- Grunert, K. G. (2005) Food quality and safety: consumer perception and demand, *European Review of Agricultural Economics*, 32(3), s. 369-391. doi: 10.1093/eurrag/jbi011.
- Guenther, S. *et al.* (2009) Virulent Bacteriophage for Efficient Biocontrol of *Listeria monocytogenes* in Ready-To-Eat Foods, *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), s. 93. doi: 10.1128/AEM.01711-08.
- Hammes, W. P. og Hertel, C. (2006) The Genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*, i Dworkin, M., *et al.* (red.) *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria*. New York, NY: Springer US, s. 320-403.
- Herrera, J. J. R. (2016) Chapter 13 - Safety of ready-to-eat seafood, i Kotzekidou, P. (red.) *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. San Diego: Academic Press, s. 225-240.
- Hildebrandt, G. og Erol, I. (1988) Sensorical and microbiological investigation of sliced vacuum-packed smoked salmon, *Archiv fur Lebensmittelhygiene*, 39(5), s. 120-123. Tilgjengelig fra: <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0023774960&partnerID=40&md5=5dced73459eaecb511bd27cac82f5b26>.
- Hoel, S. *et al.* (2015) Assessment of Microbiological Quality of Retail Fresh Sushi from Selected Sources in Norway, *Journal of Food Protection*, 78(5), s. 977-982. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-14-480.
- Hoel, S., Jakobsen, A. N. og Vadstein, O. (2017) Effects of storage temperature on bacterial growth rates and community structure in fresh retail sushi, *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), s. 698-709. doi: 10.1111/jam.13527.
- Hoel, S., Vadstein, O. og Jakobsen, A. N. (2019) The Significance of Mesophilic *Aeromonas* spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood, *Microorganisms*, 7(3), s. 91. Tilgjengelig fra: <http://www.mdpi.com/2076-2607/7/3/91>.
- Hsin-I Feng, C. (2012) The Tale of Sushi: History and Regulations, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 11(2), s. 205-220. doi: 10.1111/j.1541-4337.2011.00180.x.

- Huss, H. H., Reilly, A. og Karim Ben Embarek, P. (2000) Prevention and control of hazards in seafood, *Food Control*, 11(2), s. 149-156. doi: [https://doi.org/10.1016/S0956-7135\(99\)00087-0](https://doi.org/10.1016/S0956-7135(99)00087-0).
- Ilbäck, J. (2017) *Proficiency Testing: Food Microbiology*. Livsmedelsverket. Tilgjengelig fra: <https://www.livsmedelsverket.se/globalassets/publikationsdatabas/rapporter/2017/proficiency-testing-microbiology-report-food-april-2017.pdf> (Hentet: 10.05.19).
- Jamuna, M. og Jeevaratnam, K. (2004) Isolation and partial characterization of bacteriocins from *Pediococcus* species, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), s. 433-439. doi: 10.1007/s00253-004-1576-8.
- Janda, J. M. og 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), s. 2761-2764. doi: 10.1128/JCM.01228-07.
- Jaroni, D. og Brashears, M. M. (2000) Production of Hydrogen Peroxide by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* as Influenced by Media Used for Propagation of Cells, *Journal of Food Science*, 65(6), s. 1033-1036. doi: 10.1111/j.1365-2621.2000.tb09412.x.
- Jeppesen, V. F. og Huss, H. H. (1993) Antagonistic activity of two strains of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* in a model fish product at 5°C, *International Journal of Food Microbiology*, 19(3), s. 179-186. doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(93\)90075-R](https://doi.org/10.1016/0168-1605(93)90075-R).
- Juturu, V. og Wu, J. C. (2018) Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications, *Biotechnology Advances*, 36(8), s. 2187-2200. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.10.007>.
- Kao, C. T. og Frazier, W. C. (1966) Effect of lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus*, *Applied microbiology*, 14(2), s. 251-255. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC546660/>.
- Kim, H. W. *et al.* (2017) Raw ready-to-eat seafood safety: microbiological quality of the various seafood species available in fishery, hyper and online markets, *Letters in Applied Microbiology*, 64(1), s. 27-34. doi: doi:10.1111/lam.12688.
- Klein, G. *et al.* (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 41(2), s. 103-125. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(98\)00049-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(98)00049-X).
- Kotzekidou, P. (2016) Chapter 3 - Factors influencing microbial safety of ready-to-eat foods, i Kotzekidou, P. (red.) *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods*. San Diego: Academic Press, s. 33-50.
- Kumar, S., Stecher, G. og Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), s. 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054.
- Leistner L. og Gorris, L. G. M. (1995) Food preservation by hurdle technology, *Trends in Food Science & Technology*, 5, s. 41-46. Tilgjengelig fra: [https://www.aua.gr/skandamis/Literature/Enotita\\_4/TR\\_FOOD\\_SCI\\_TECHNOL6,41-46.pdf](https://www.aua.gr/skandamis/Literature/Enotita_4/TR_FOOD_SCI_TECHNOL6,41-46.pdf).
- Lerfall, J., Thomassen, G. M. og Jakobsen, A. (2018) Quality of fresh saithe (*Pollachius virens*) in modified atmosphere packages as affected by the gas composition, 18, s. 147-156. doi: 10.1016/j.fpsl.2018.11.006.
- Leroi, F. *et al.* (1998) Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C, *International Journal of Food Microbiology*, 39(1), s. 111-121. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00126-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00126-8).

- Leroi, F. *et al.* (2001) Research of quality indices for cold-smoked salmon using a stepwise multiple regression of microbiological counts and physico-chemical parameters, *Journal of Applied Microbiology*, 90(4), s. 578-587. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01283.x.
- Leroi, F. *et al.* (2008) *Hurdle technology to ensure the safety of seafood products*.
- Leroi, F. (2010) Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products, *Food Microbiology*, 27(6), s. 698-709. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.05.016>.
- Leroi, F. *et al.* (2015) Selection of bioprotective cultures for preventing cold-smoked salmon spoilage, *International Journal of Food Microbiology*, 213, s. 79-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.05.005>.
- Lewus, C. B., Kaiser, A. og Montville, T. J. (1991) Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat, *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), s. 1683-1688. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC183452/>.
- Liang, W.-L. *et al.* (2016) The microbiological quality of take-away raw salmon finger sushi sold in Hong Kong, *Food Control*, 69, s. 45-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.04.015>.
- Lyhs, U., Korkeala, H. og Björkroth, J. (2002) Identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum-packaged 'gravad' rainbow trout using ribotyping, *International Journal of Food Microbiology*, 72(1), s. 147-153. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(01\)00634-1](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00634-1).
- Løvdal, T. (2015) The microbiology of cold smoked salmon, *Food Control*, 54, s. 360-373. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.02.025>.
- Madigan *et al.* (2012) *Brock Biology of Microorganisms*. Thirteenth Edition. utg. Pearson Education.
- Mann, N. H. (2008) The potential of phages to prevent MRSA infections, *Research in Microbiology*, 159(5), s. 400-405. doi: <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2008.04.003>.
- Matamoros, S. *et al.* (2009a) Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria Used To Improve the Safety and Quality of Vacuum-Packaged Cooked and Peeled Tropical Shrimp and Cold-Smoked Salmon, *Journal of Food Protection*, 72, s. 365-374. doi: 10.4315/0362-028X-72.2.365.
- Matamoros, S. *et al.* (2009b) Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria, *Food Microbiology*, 26(6), s. 638-644. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.011>.
- Miguéis, S. *et al.* (2015) Evaluation of ready to eat sashimi in northern Portugal restaurants, *Food Control*, 47, s. 32-36. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.06.025>.
- Miotto, M. *et al.* (2019) Development and application of a real-time polymerase chain reaction method for quantification of *Escherichia coli* in oysters (*Crassostrea gigas*), *Food Microbiology*, 77, s. 85-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.08.015>.
- Montville, T. J. og Matthews, K. R. (2013) Physiology, Growth, and Inhibition of Microbes in Foods, i Doyle, M. P. og Buchanan, R. L. (red.) *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Washington, D. C.: ASM Press, s. 3-18.
- Morgan, S. M. *et al.* (2001) Evaluation of a spray-dried lactacin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems, *Letters in Applied Microbiology*, 33(5), s. 387-391. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.01016.x.
- Muyzer, G., de Waal, E. C. og Uitterlinden, A. G. (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain



- reaction-amplified genes coding for 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), s. 695-700. Tilgjengelig fra: <https://aem.asm.org/content/aem/59/3/695.full.pdf>.
- Namiq, F. K. og Milne, D. (2017) Effect of Fillet Thickness on Quality and Shelf Life of Gravlax Salmon, *Journal of Aquaculture & Marine Biology*, 6(2). doi: 10.15406/jamb.2017.06.00149
- Nigam, A. *et al.* (2012) In-vitro Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria against common enteric pathogens Astha Nigam, Madhusudan HV, and Neelam Bhola Department of Microbiology, CloneGen Biotechnology (P) Ltd, 1.
- Nilsson, L. *et al.* (2005) Growth inhibition of *Listeria monocytogenes* by a nonbacteriocinogenic *Carnobacterium piscicola*, *Journal of Applied Microbiology*, 98(1), s. 172-183. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02438.x.
- Niskanen, A. og Aalto, M. (1978) Comparison of selective media for coagulase-positive enterotoxigenic *Staphylococcus aureus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 35(6), s. 1233-1236. Tilgjengelig fra: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/677885>  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/PMC243016/>.
- Næringsmiddelhygieneforskriften (2017) *Forskrift om næringsmiddelhygiene*. Tilgjengelig fra: [https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623/KAPITTEL\\_10-4-1-1#KAPITTEL\\_10-4-1-1](https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623/KAPITTEL_10-4-1-1#KAPITTEL_10-4-1-1) (Hentet: 12.10.2018).
- Obis, Paris og Ouwehand (2019) Chapter 22 - The Safety of Lactic Acid Bacteria for Use in Food, i Vinderola, *et al.* (red.) *Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects*. CRC Press.
- Olsen, S. O. (2003) Understanding the relationship between age and seafood consumption: the mediating role of attitude, health involvement and convenience, *Food Quality and Preference*, 14(3), s. 199-209. doi: [https://doi.org/10.1016/S0950-3293\(02\)00055-1](https://doi.org/10.1016/S0950-3293(02)00055-1).
- Paludan-Müller, C. *et al.* (1998) Evaluation of the role of *Carnobacterium piscicola* in spoilage of vacuum- and modified-atmosphere-packed cold-smoked salmon stored at 5°C, *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), s. 155-166. doi: [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00133-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00133-5).
- Peiris, I. P. *et al.* (2009) Gravad (Gravlax) and cold-smoked salmon, still a potential source of listeriosis, *Journal of Foodservice*, 20(1), s. 15-20. doi: doi:10.1111/j.1748-0159.2008.00118.x.
- Pilet, M.-F. *et al.* (1995) Evidence for Two Bacteriocins Produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* Isolated from Fish and Active Against *Listeria monocytogenes*, *Journal of Food Protection*, 58(3), s. 256-262. doi: 10.4315/0362-028x-58.3.256.
- Pilet, M.-F. og Leroi, F. (2010) *Applications of protective cultures, bacteriocins and bacteriophages in fresh seafood and seafood products*.
- Rachtanapun, C. *et al.* (2018) Effect of chitosan on physical properties, texture and shelf life of sushi rice, *Italian Journal of Food Science*, s. 82-87. Tilgjengelig fra: <https://search.proquest.com/docview/2052776487/fulltextPDF/BAFA3135212F4F91PQ/1?accountid=12870> (Hentet: 01.02.19).
- Rodgers, S. (2001) Preserving non-fermented refrigerated foods with microbial cultures—a review, *Trends in Food Science & Technology*, 12(8), s. 276-284. doi: [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00093-0](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00093-0).

- Saitou, N. og Nei, M. (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), s. 406-425. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454.
- Saraoui, T. *et al.* (2017) Improving simultaneously the quality and safety of cooked and peeled shrimp using a cocktail of bioprotective lactic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*, 241, s. 69-77. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.09.024>.
- Schmelcher, M. og Loessner, M. J. (2016) Bacteriophage endolysins: applications for food safety, *Current Opinion in Biotechnology*, 37, s. 76-87. doi: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2015.10.005>.
- Scientific, T. (u.å.) 260/280 and 260/230 Ratios. Tilgjengelig fra: <https://www.nhm.ac.uk/content/dam/nhmwww/our-science/dpts-facilities-staff/Coreresearchlabs/nanodrop.pdf> (Hentet: 12.05 2019).
- Sieuwert, S. *et al.* (2008) A simple and fast method for determining colony forming units, *Letters in Applied Microbiology*, 47(4), s. 275-278. doi: 10.1111/j.1472-765X.2008.02417.x.
- Sigma Aldrich (u.å.) *Selective & Differential* Tilgjengelig fra: <https://www.sigmaaldrich.com/analytical-chromatography/microbiology/microbiology-products.html?TablePage=18291540> (Hentet: 06.05 2019).
- Silva, C. C. G., Silva, S. P. M. og Ribeiro, S. C. (2018) Application of Bacteriocins and Protective Cultures in Dairy Food Preservation, *Frontiers in Microbiology*, 9(594). doi: 10.3389/fmicb.2018.00594.
- Silva, J. *et al.* (2002) Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria, *Letters in Applied Microbiology*, 34(2), s. 77-81. doi: 10.1046/j.1472-765x.2002.01055.x.
- Simon, S. S. og Sanjeev, S. (2007) Prevalence of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in fishery products and fish processing factory workers, *Food Control*, 18(12), s. 1565-1568. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2006.12.007>.
- Singh, V. P. (2018) Recent approaches in food bio-preservation - a review, 8(1), s. 104-111. doi: 10.4314/ovj.v8i1.16.
- SjømatNorge (2018) *Handelen bidrar til sunnere konsum*. Tilgjengelig fra: <https://sjomatnorge.no/handelen-bidrar-til-sunnere-konsum/> (Hentet: 19.04 2019).
- Smith, L. *et al.* (2005) Reduction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* in Ground Beef Using Lactic Acid Bacteria and the Impact on Sensory Properties, *Journal of Food Protection*, 68(8), s. 1587-1592. doi: 10.4315/0362-028x-68.8.1587.
- Sparo, M. *et al.* (2013) Bio-preservation of ground beef meat by *Enterococcus faecalis* CECT7121, 44, s. 43-49. doi: 10.1590/S1517-83822013005000003.
- Strahsburger, E. *et al.* (2016) Microdot method: Used with chromogenic agar is a useful procedure for sanitary monitoring in aquaculture, 44, s. 742-749. doi: 10.3856/vol44-issue4-fulltext-9.
- Sung-Mee, L. og Dong-Soon, I. (2009) Screening and Characterization of Probiotic Lactic Acid Bacteria Isolated from Korean Fermented Foods, *J. Microbiol. Biotechnol*, 19(2), s. 178-186. doi: 10.4014/jmb.0804.269.
- Tamang, J. P. *et al.* (2005) Identification of predominant lactic acid bacteria isolated from traditionally fermented vegetable products of the Eastern Himalayas, *International Journal of Food Microbiology*, 105(3), s. 347-356. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.04.024>.

- Temmerman, R., Huys, G. og Swings, J. (2004) Identification of lactic acid bacteria: culture-dependent and culture-independent methods, *Trends in Food Science & Technology*, 15(7), s. 348-359. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.12.007>.
- Thomas, P. *et al.* (2015) Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples, *Biotechnology Reports*, 8, s. 45-55. doi: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2015.08.003>.
- Truelstrup Hansen (1996) *Quality of chilled, vacuum packed cold-smoked salmon*. (23-96). Copenhagen, Denmark: Danish Institute for Fisheries Research and The Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen. Tilgjengelig fra: <https://core.ac.uk/download/pdf/13707058.pdf> (Hentet: 24.04.19).
- Truelstrup Hansen, L. og Huss, H. H. (1998) Comparison of the microflora isolated from spoiled cold-smoked salmon from three smokehouses, *Food Research International*, 31(10), s. 703-711. doi: [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(99\)00049-6](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(99)00049-6).
- Turner, S. *et al.* (1999) Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis<sup>1</sup>, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), s. 327-338. doi: 10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x.
- Vaiyapuri, M., Toms C, J. og Lalitha K.V. (2016) Distribution of Pathotypes of *E. coli* in seafood from retail markets of Kerala (India), *Indian Journal of Fisheries*, 63, s. 152-155. doi: 10.21077/ijf.2016.63.1.49671-24
- Van de Peer, Y., Chapelle, S. og De Wachter, R. (1996) A Quantitative Map of Nucleotide Substitution Rates in Bacterial rRNA, *Nucleic Acids Research*, 24(17), s. 3381-3391. doi: 10.1093/nar/24.17.3381.
- Vescovo, M., Scolari, G. og Zacconi, C. (2006) Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimicrobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon, *Food Microbiology*, 23(7), s. 689-693. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.12.002>.
- Wiernasz, N. *et al.* (2017) Lactic Acid Bacteria Selection for Biopreservation as a Part of Hurdle Technology Approach Applied on Seafood, *Frontiers in Marine Science*, 4(119). doi: 10.3389/fmars.2017.00119.
- Yang, S.-C. *et al.* (2014) Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals, *Frontiers in Microbiology*, 5(241). doi: 10.3389/fmicb.2014.00241.
- Zacharof, M. P. og Lovitt, R. W. (2012) Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria a Review Article, *APCBEE Procedia*, 2, s. 50-56. doi: <https://doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.010>.

Tabell 1: Alle bakterieisolatene benyttet i oppgaven.

Isolatnr.	Stav/kokk	Produkt	Produsent
1	S	Røykelaks	E
6	S	Røykelaks	E
7	S	Røykelaks	E
8	S	Røykelaks	H
12	S	Røykelaks	H
13	S	Røykelaks	H
14	S	Røykelaks	H
21	S	Røykelaks	H
27	S	Gravlaks	E
30	S	Gravlaks	E
35	S	Gravlaks	E
36	S	Gravlaks	E
38	S	Gravlaks	E
42	S	Røykelaks	D
44	S	Røykelaks	D
45	S	Røykelaks	D
55	S	Røykelaks	D
60	S	Røykelaks	E
63	S	Sushi	A
67	S	Sushi	A
68	K	Sushi	A
74	S	Sushi	B
75	S	Sushi	B
88	K	Sushi	B
90	S	Røykelaks	F
93	K	Røykelaks	F
95	S	Røykelaks	F
105	K	Gravlaks	D
113	S	Gravlaks	D
126	K	Sushi	A
140	S	Sushi	B
151	K	Sushi	A
152	K	Sushi	A
153	S	Sushi	A
159	S	Røykelaks	F
176	S	Røykelaks	E
189	K	Røykelaks	F
194	S	Røykelaks	F
198	S	Sushi	A
199	S	Sushi	A
202	S	Sushi	A
204	S	Sushi	A
208	S	Røykelaks	E
214	K	Røykelaks	F

221	S	Røykelaks	E
227	S	Gravlaks	D
228	S	Gravlaks	D
232	S	Gravlaks	D
236	S	Gravlaks	D
237	S	Gravlaks	F
238	S	Gravlaks	F
246	S	Gravlaks	F
248	S	Gravlaks	F
257	S	Gravlaks	G
258	S	Røykelaks	G
259	K	Røykelaks	G
260	S	Røykelaks	G
265	S	Gravlaks	F
273	S	Gravlaks	F
292	S	Sushi	A
294	S	Sushi	A
298	S	Sushi	A
299	K	Sushi	A
301	S	Sushi	A
303	S	Røykelaks	D
305	S	Røykelaks	D
306	S	Gravlaks	D
309	S	Gravlaks	D
312	S	Gravlaks	D
316	S	Sushi	B
321	S	Sushi	B
327	S	Sushi	B
328	S	Sushi	B
340	S	Sushi	C
342	K	Sushi	C
344	S	Sushi	C
345	S	Sushi	C
346	S	Sushi	C
357	S	Sushi	C
358	S	Sushi	C
361	S	Sushi	C
368	S	Røykelaks	F
384	S	Røykelaks	E
388	S	Røykelaks	E
392	S	Røykelaks	E
396	S	Sushi	B
405	K	Sushi	B
406	K	Sushi	B
408	S	Sushi	B
420	S	Gravlaks	D

423	S	Gravlaks	D
426	S	Sushi	A
434	S	Sushi	A
443	S	Røykelaks	D
452	K	Sushi	C
455	S	Sushi	C
457	S	Sushi	C
461	S	Sushi	C
466	S	Sushi	A
468	S	Sushi	A

Tabell 2: Kvantifiseringsdata for isolatene, med både renhet og konsentrasjon for DNA, før sekvensering.

Isolatnr.	A260/A280 (renhet)	Snitt ng/ $\mu$ l (DNA-konsentrasjon)
6	1,88	73,25
8	1,99	79,07
12	1,87	75,66
14	1,85	62,79
21	1,90	84,35
27	1,83	83,43
30	1,89	76,02
35	1,86	90,69
42	1,88	74,82
55	1,90	82,33
60	1,90	74,48
74	1,86	89,64
90	2,01	64,88
95	1,85	76,18
113	1,86	70,04
153	1,84	75,15
159	1,90	66,45
176	1,89	66,68
199	1,90	78,76
202	1,89	79,07
204	1,90	84,17
208	1,92	60,17
214	1,84	59,17
227	1,83	71,00
236	1,90	62,79
273	1,87	67,84
316	1,82	105,69
358	1,86	67,36

368	1,80	64,88
384	1,84	70,54
392	1,92	67,69
426	1,85	89,13
461	1,93	72,73
466	1,91	71,92
468	1,86	71,41



Tabell 3: Identifisering etter sekvensering av isolatene fra røkelaks. Inkluderer isolatnummer, identifikasjon, prosentvis identifikasjon, Query Score angitt i prosent og lengde på sekvensen. E-verdi hos alle sekvensene var 0.

Isolatnr.	Identifikasjon	ID (%)	Query score (%)	Sekvenslengde
6	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>gallinarum</i> )	99,8	99	880
8	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,5	99	1089
12				
14	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,7	99	1016
21	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,9	99	1098
42	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>maltaromaticum</i> )	99,8	99	1016
55	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>gallinarum</i> )	99,8	100	929
60				
90				
95	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,8	100	1030
159	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>gallinarum</i> )	99,8	99	869
176	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,8	99	1042
208	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,7	99	987
214	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,7	99	985
368	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,9	99	1033
384	<i>Carnobacterium</i> sp.	99,9	99	978
392	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,7	100	976

Tabell 4: Identifisering etter sekvensering av isolater fra sushi. Inkluderer isolatnummer, identifikasjon, prosentvis identifikasjon, Query Score angitt i prosent og lengde på sekvensen. E-verdi hos alle sekvensene var 0.

Isolatnr.	Identifikasjon	ID (%)	Query score (%)	Sekvenslengde
74	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,5	99	1093
153	<i>Carnobacterium</i> sp.	99,7	100	962
199	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,9	99	955
202	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,9	99	1052
204	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,8	100	1031
316				
358	<i>Leuconostoc</i> sp. ( <i>lactis</i> )	99,8	99	986
426	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,9	99	1017
461	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>gallinarum</i> )	100	99	988
466	<i>Carnobacterium</i> sp.	99,7	100	1025
468	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,9	100	877

Tabell 5: Identifisering etter sekvensering av isolater fra gravlaks. Inkluderer isolatnummer, identifikasjon, prosentvis identifikasjon, Query Score angitt i prosent og lengde på sekvensen. E-verdi hos alle sekvensene var 0.

Isolatnr.	Identifikasjon	ID (%)	Query score (%)	Sekvenslengde
27	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,8	99	1034
30				
35	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>maltaromaticum</i> )	99,7	99	1083
113	<i>Carnobacterium</i> sp.	100	99	474
227	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>gallinarum</i> )	99,6	100	940
236	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,8	100	882
273	<i>Carnobacterium</i> sp. ( <i>divergens</i> )	99,9	99	876