

Kari Hjelen

Karakterisering av bakterieisolater fra kultivert og vill tare

Characterization of Bacterial Isolates from
Cultivated and Wild Kelp

Bacheloroppgave i Kjemiingeniør
Veileder: Ina Merete Stuen

Mai 2022

Kari Hjelen

Karakterisering av bakterieisolater fra kultivert og vill tare

Characterization of Bacterial Isolates from Cultivated and Wild Kelp

Bacheloroppgave i Kjemingeniør
Veileder: Ina Merete Stuen
Mai 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for materialteknologi



Kunnskap for en bedre verden



NTNU

Institutt for materialteknologi

Karakterisering av bakterieisolater fra kultivert og vill tare

Characterization of Bacterial Isolates from Cultivated and
Wild Kelp

Bacheloroppgave

Prosjektnummer: IMA-B-10-2022

Innleveringsdato: 20.05.2022

Gradering: Lukket

Forfattere: Kari Hjelen

Intern veileder: Ina Merete Stuen

Oppdragsgiver: SINTEF Industri, avd. Bioteknologi og Nanomedisin

Kontaktperson: Anne Tøndervik, Håvard sletta

FORORD

Denne oppgaven ble utført våsemesteret 2022 som en bacheloroppgave ved studieprogrammet kjemiingeniør ved Norges Teknisk-naturvitenskaplige universitet. Oppgaven ble gjort i samarbeid med forskningsgruppen for Industriell og Marin Bioteknologi som tilhører avdelingen for Bioteknologi og Nanomedisin i SINTEF Industri. Den praktiske delen av bacheloroppgaven ble gjennomført på SINTEF sine laboratorier på Gløshaugen, Trondheim. Hensikten med oppgaven var å studere variasjonene i de mikrobielle samfunnet på ulike arter av viltvoksende og kultivert tare høstet fra ulike steder utenfor Trøndelagskysten. Oppgaven var tilknyttet forskningsplattformen The Norwegian Seaweed Biorefinery Platform, ledet av NTNU Institutt for Bioteknologi og Matvitenskap, og finansiert av Forskningsrådet.

Det rettes en stor takk til alle som har bidratt til veiledning og råd under gjennomføring av den praktiske delen av oppgaven. Spesielt vil jeg takke Senioringeniør Tone Haugen for bistand og veiledning under laboratoriearbeidet. I tillegg vil jeg takke Master of science Silje Malene Olsen for opplæring i bruk av BioLector. Ansatte ved SINTEF Industri, avdeling Bioteknologi og Nanomedisin vil jeg takke for gode råd og godt humør under både gjennomføringen av den praktiske delen og under skriveprosessen. Spesielt vil jeg takke Seniorforsker Øystein Arlov for gjennomgang av rapporten og nyttige tilbakemeldinger før innlevering av rapport. Jeg vil også rette en stor takk til mine to eksterne veiledere i SINTEF, Forskningsleder Håvard Sletta og Seniorforsker Anne Tøndervik for muligheten til å skrive oppgave for SINTEF, rettleiding under laboratoriearbeid, gjennomgang av resultater og hjelp under skriveprosessen. Til slutt vil jeg takke veilederen min ved NTNU, Ina Merete Stuen. Ina vil jeg takke for sin tilgjengelighet, veiledning og innspill i løpet av prosjektperioden.



Kari Hjelen, Trondheim 20.05.21



SAMMENDRAG

Overflaten av tare er dekket med mikrobielle samfunn som kan ha egenskapene til å bryte ned tareproduserte karbonforbindelser. Disse organismene vil bidra til karbonsyklusen i økosystemet til store tareskoger og samtidig bidra i resirkuleringen av biomassen fra tare. I dag vet vi lite om identiteten til mikroorganismene som lever i disse samfunnene og hvilke degraderende egenskaper de har. I dette prosjektet ble et utvalg på 46 bakterieisolater isolert fra seks ulike tarearter høstet fra forskjellige steder langs trøndelagskysten plukket ut basert på fenotypiske ulikheter. Fra bakterieisolatene ble genomisk DNA isolert for å metagenomisk identifisere bakterieisolatene ved sekvensering av 16S-rDNA sekvensen. Av de identifiserte isolatene ble et utvalg på 29 isolater studert for polysakkarid-degraderende aktivitet på substratene fucoidan, laminaran og alginat, i tillegg til sukkeralkoholen mannitol via dyrkning i mikrofermentorer.

Det var mulig å metagenomisk identifisere 41 av de opprinnelige bakterieisolatene. Identifiseringen viste en variasjon i det mikrobielle basert på både tareart og høstingslokasjon. Bakteriene ble fordelt på femten slekter og åtte familier. Familien med flest tilhørende bakterieisolater ble funnet til å være *Flavobacteriaceae* (41,5%) med slektene *Cellulophaga*, *Algibacter*, *Olleya*, *Lacinutrix*, *Flavobacterium*, *Polaribacter* og *Nonlabens*. Etterfulgt av familien *Pseudoalteromonadaceae* (17,1%) med slekten *Pseudoalteromonas*. Variasjonene i det mikrobielle samfunnet ble underbygd av tidligere studier gjort på andre arter av grønn- og brunalger andre steder i verden. Fra studiet av polysakkaridaktivitet ble ti av 29 (35%) isolater funnet til å ha økt biomasseproduksjon ved tilsats av minst ett av substratene testet. Den økte biomassen ga indikasjon på polysakkarid-degraderende egenskaper for disse bakteriene. Her ble blant annet slektene *Cellulophaga*, *Olleya*, *Algibacter*, *Nonlabens* og *Pseudoalteromonas* funnet til å ha slike egenskaper. Resultatene anskaffet under prosjektet viser til en synlig variasjon i mikrobielle samfunn på ulike tarearter hvor en stor andel av disse er polysakkarid-degraderende bakterier.

ABSTRACT

The surfaces of kelp are covered with microbial communities that may have the properties of degrading kelp-produced carbon compounds. These organisms can contribute to the carbon cycle in the ecosystem of large kelp forests and at the same time contribute to the recycling of biomass from kelp. Little is known about the identity of these microorganisms and what degrading properties they have. 46 bacterial isolates were in this study isolated from six different kelp species harvested from different places along the coast of Trøndelag. The bacterial isolates were selected based on phenotypic differences. Genomic DNA was isolated from the isolates to metagenomically identify them by sequencing of the 16S rDNA sequence. A sample of 29 identified isolates were studied for polysaccharide activity on the substrates fucoidan, laminaran, alginate, and the sugar alcohol mannitol by High throughput screening in microfermentors.

It was possible to metagenomically identify 41 of the 46 bacterial isolates. The identification showed a variation in the microbiota based on both kelp species and harvest location. The bacteria were found to belong to fifteen genera and eight families. The family with the most associated bacterial isolates was found to be *Flavobacteriaceae* (41.5%) with the genera *Cellulophaga*, *Algibacter*, *Olleya*, *Lacinutrix*, *Flavobacterium*, *Polaribacter*, and *Nonlabens*. Followed by the family *Pseudoalteromonadaceae* (17.1%) with the genus *Pseudoalteromonas*. The variations in the microbial community were substantiated by previous studies done on other species of green and brown algae elsewhere in the world. From the study of polysaccharide activity, ten of 29 (35%) isolates were found to have increased biomass production by the addition of at least one of the substrates. Where increased biomass indicated polysaccharide degrading properties. The genera *Cellulophaga*, *Olleya*, *Algibacter*, *Nonlabens*, and *Pseudoalteromonas* were some of the genera found to have polysaccharide-degrading bacteria. The results obtained during the project refer to a visible variation in microbial communities on different kelp species, where a large proportion of these have are polysaccharide-degrading activity.

INNHALDSFORTEGNELSE

FORORD	2
SAMMENDRAG	3
ABSTRACT	4
INNHALDSFORTEGNELSE	5
1. INNLEDNING	7
2. TEORI	9
2.1. ALGER, DEFINISJON OG KLASSIFISERING.....	9
2.1.1. ARTSBESKRIVELSE, ØKOLOGI OG BRUKSOMRÅDER FOR ULIKE BRUNALGER.....	9
2.2. MARINE POLYSAKKARIDER OG SUKKERALKOHOLER	11
2.2.1. STRUKTUR OG BRUKSOMRÅDER FOR ALGINAT.....	12
2.2.2. STRUKTUR OG BRUKSOMRÅDER FOR FUCOIDAN.....	13
2.2.3. STRUKTUR OG BRUKSOMRÅDER FOR MANNITOL	13
2.2.4. STRUKTUR OG BRUKSOMRÅDER FOR LAMINARAN	14
2.3. MIKROBIOM.....	14
2.3.1. ULIKE MARINE BAKTERIER OG DERES KARAKTERISTIKA.....	15
2.3.2. POLYSAKKARID-DEGRADERENDE BAKTERIER FRA TARE.....	17
2.4. RELEVANTE METODER FOR IDENTIFISERING AV BAKTERIER OG BIOAKTIVITET	18
2.4.1. ISOLERING AV GENOMISK DNA FRA MIKROORGANISMER.....	18
2.4.2. DENOVIX DS-11 SERIES SPECTHROPHOTOMETER, MÅLING AV DNA-KONSENTRASJON.....	19
2.4.3. AMPLIFISERING AV 16S rDNA	20
2.4.4. SEPERASJON AV MAKROMOLEKYLER MED GELELEKTROFORESE.....	21
2.4.5. ARTSBESTEMMELSE VED SEKVENSERING AV 16S rDNA.....	22
2.4.6. UNDERSØKELSER AV BIOAKTIVITET OG VEKST VED BRUK AV HIGH THROUGHPUT SCREENING.....	23
3. MATERIALER OG METODE	25
3.1. MATERIALER.....	25
3.2. METODE	27
3.2.1. KULTIVERING AV BAKTERIER ISOLERT FRA TARE	27
3.2.2. ISOLERING AV GENOMISK DNA, PCR OG RENHETSMÅLINGER	28
3.2.3. SANGER-SEKVENSERING AV 16S rDNA.....	30
3.2.4. KARBONKILDE-SCREENING I BIOLECTOR.....	31
4. RESULTATER OG DISKUSJON	33
4.1. KULTIVERING AV ISOLATER HØSTET FRA TARE.....	33
4.2. KONSENTRASJONSMÅLINGER AV GENOMISK DNA OG GELELEKTROFORESE	33

4.3.	METAGENOMISK IDENTIFISERING	35
4.4.	MÅLINGER AV BIOMASSE VED TILSATS AV ULIKE KARBONKILDER	39
4.5.	VIDERE ARBEID	45
5.	KONKLUSJON	46
	REFERANSER.....	47
	VEDLEGG.....	54
	VEDLEGG 1 – PRØVEOVERSIKT.....	I
	VEDLEGG 2 – VEIESKJEMA	II
	VEDLEGG 4 – OPPSETT KARBONKILDE-SCREENING	III
	VEDLEGG 4 – KONSENTRASJONSMÅLINGER.....	V
	VEDLEGG 5 – BILDER AV ISOLATENE DYRKET PÅ MARINE BROTH AGAR	VI
	VEDLEGG 7 – MÅLINGER OG OBSERVASJONER FRA KARBONKILDE-SCREENING	XLI
	VEDLEGG 8 – PROTOKOLLER.....	XLIII
	VEDLEGG 9 – FARE OG SIKKERHETSSETNINGER.....	XLVII
	VEDLEGG 10 - RISIKOVURDERING.....	L

1. INNLEDNING

Dyrkning av tare har blitt et større tema verden over, da taren kan bidra til å løse problemer vi i dag har med produksjon av mat, fôr og andre typer råvare. I motsetning til landbruk kan tare dyrkning ha en positiv effekt på miljøet. Tare benytter seg av sollys og næringsstoffer i havet og tilføring av gjødsel eller annen næring er unødvendig. Tare har også en evne til å ta opp karbondioksid og nitrogen, samtidig som den produserer oksygen, som bedrer miljøet over og under vann [1]. Det mikrobielle samfunnet på overflaten og i taren er svært viktig i denne prosessen.

Det marine mikrobiomet er det globale kollektivet av alle mikroorganismer i havet og andre akvatiske miljøer. Det marine mikrobiomet inkluderer ikke bare organismene i havet, men også de mikrobielle samfunnene som lever i og på individuelle økosystemer som for eksempel korallrev og tareskoger [2]. Overflaten til taren er velegnet for slike samfunn av mikroorganismer da taren skiller ut næringsstoffer for bakterier og andre organismer. Mikrobielle samfunn som lever på overflaten av tare er svært komplekse, dynamiske og består både av bakterier, sopp, protozoer og sporer. Disse mikrobielle samfunnene kan ha viktige roller i økosystemet til tareskogene, da noen av bakteriene er kjent for å degradere komplekse karbonforbindelser i celleveggen til tareplantene og har derfor en viktig rolle i den globale karbonsyklusen. I de siste tiårene har en stor forskningsinnsats blitt rettet mot å studere disse bakteriesamfunnene for å forstå komposisjonen og dynamikken til disse samfunnene i forhold til økologien til interaksjoner mellom bakterier og tare. Studier som omhandler omfattende vurderinger av totale bakteriesamfunn på algeoverflatene og de polysakkarid-degraderende bakteriene er derimot få. Av de studiene som finnes har det blitt funnet en diversitet av bakteriesamfunn basert på ulike tarearter, og geografiske og tidsmessige variasjoner [3].

Opgaven er tilknyttet forskningsplattformen SBP-N (The Norwegian Seaweed Biorefinery Platform), som har som hovedmål å øke og dele kunnskap innen dyrkning og høsting av tare, prosessering og bioraffineri, og bruksområder. Hensikten til plattformen er å fungere som et knutepunkt mellom forskning og industri samt andre interessenter. Forskningen i prosjektet har hovedfokus på karakterisering av biomassen og utvikling av teknologi for å sikre videre økonomiske og miljøvennlige bioraffineringsprosesser [4]. Prosjektet finansieres av Forskningsrådet, og er et samarbeid på tvers av forskningsinstitusjonene NTNU, SINTEF Industri,

SINTEF Ocean, NMBU, Nofima og Møreforskning, hvorav SINTEF Industri avdeling Bioteknologi og Nanomedisin er oppdragsgiver for denne oppgaven. Prosjektet tar utgangspunkt i bakterieisolater hentet fra ulike arter vill og kultivert tare gjennom vår og sommer 2020, høstet forskjellige steder langs Trøndelagskysten. Villhøstede arter var henholdsvis Martaum, Blæretang, Grisetang, Sagtang og Rødalge på Sagtang, som alle var høstet i Aure, Møre og Romsdal, samt to planter av arten Sukkertare (*Saccharina latissima*) som ble høstet ved Grip, Møre og Romsdal. Tareartene av kultivert tare var henholdsvis to forskjellige planter av arten Butare (*Alaria esculenta*) og tre forskjellige planter av sukkertare.

Under den praktiske utførelsen av oppgaven ble det foretatt taksonomisk identifisering av et utvalg bakterieisolater fra seks ulike tarearter ved hjelp av matagenomiske studier. I tillegg ble det identifiserte mikrobielle samfunnet undersøkt for polysakkarid-degraderende egenskaper ved en anrikningsbasert tilnærming på henholdsvis laminaran, alginat og fucoidan, i tillegg til sukkeralkoholen mannitol. Problemstillingen som ble etterprøvd i løpet av oppgaven er som følger, «Er det en variasjon i det mikrobielle samfunnet som vokser på overflaten av tare basert på tareart, og innehar disse samfunnene polysakkarid-degraderende egenskaper spesielt med hensyn på de marine polysakkaridene laminaran, fucoidan og alginat?»

2. TEORI

2.1. ALGER, DEFINISJON OG KLASSIFISERING

Alger er en fellesbetegnelse på organismer som har fotosyntese, er encellede eller flercellede og lever i fuktige miljøer. Alle alger har klorofyll som er en gruppe pigmenter som benyttes av fotosyntetiske organismer til å omdanne sollys til energi gjennom en organisk syntese. Alger klassifiseres som autotrofe organismer da de er i stand til å leve og formere seg utelukkende ved uorganisk ernæring. Algene deles inn i to hovedklasser, makro og mikroalger, hvor mikroalger er små og kun synlig gjennom mikroskop, og makroalger er større og har et større mangfold i havet [5].

Makroalger også omtalt som tang og tare er makroskopiske marine alger som kan bli flere meter lange. Makroalger er klassifisert som havets primære produsenter til den marine matkjeden [5]. Makroalger deles igjen inn i grønnalger (*Chlorophyta*), brunalger (*Phaeophyta*) og rødalger (*Rhodophyta*) basert på farge, og finnes i sjøvann hvor de har tilgang på nok lys til fotosyntesen [6]. I tillegg til at makroalgene trenger saltvann og sollys, har de ofte behov for et underlag å feste seg, som for eksempel steiner i havbunnen. Dette gjør at tang og tare i all hovedsak vokser langs kysten [5].

2.1.1. ARTSBESKRIVELSE, ØKOLOGI OG BRUKSOMRÅDER FOR ULIKE BRUNALGER

Brunalger er alger som er brunpigmenterte, hvor fargen kan variere fra olivengrønn til en dyp brun nyanse. Brunfargen hos brunalgene skyldes i hovedsak fargestoffet fucoxanthin som er et xantofyll [7]. Det er hittil beskrevet 1500 ulike arter av brunalger, hvorav 175 av de er å finne langs norskekysten. Brunalgene trives best i grunt vann eller langs strandlinjen. [8,9]

En godt kjent og utbredt brunalge er *Alaria esculenta* (Butare), som er kjent for å vokse i kalde omgivelser hvor vannutvekslingen er god. Butare har bølgeformede membraner som ligner på vinger på hver side av midtribben (**Figur 1**), og kan bli opptil tre meter lang. Butare gror naturlig rundt om Europas lange kyster, hvor det er stor bølgeeksponering som blant annet i Norge, Storbritannia og Frankrike. Butare er rik på helsefremmende stoffer som vitaminer og mineraler, samtidig som jod-innholdet er lavere enn i andre brunalger, og er derfor mye brukt

i mat. I tillegg kan Butare inneholde opp mot 42% alginat som har en rekke bruksområder. Sett bort fra matlaging, blir taren også brukt innen fôr, plantenæring, kosmetikk og helsekost [10].



Figur 1 Brunalgen Butare med blad formet som vinger med en midtribbe som skiller bladene [11].

Saccharina latissima (Sukkertare) er også en tareart som er svært utbredt. Sukkertare er en kaldtvannsart og er mest utbredt på den nordlige halvkulen, hvor den forekommer fra tidevannssonen til bunnen av den fototrofiske sonen [12]. Halvparten av verdens viltvoksende tare-skoger bestående av Sukkertare vokser langs norskekysten, noe som tyder på gode forutsetninger for industriell kultivering av Sukkertare [13]. Sukkertare vokser best i temperaturer mellom 10 og 17 grader og har et sesongavhengig vekstmønster. Sukkertaren kan bli opptil 4 meter lang, har en gulaktig farge og består av lange udelte blader (uten midtribbe) med bølgede kanter som vokser opp fra stilken (**Figur 2**). I likhet med Butare, benyttes Sukkertare ofte som tilsetning i mat. Tørket tare har gjennom tidene og blir fortsatt brukt i dyrefôr da har gunstige effekter på blant annet tarmhelse. I landbruksindustrien brukes Sukkertare som gjødsel, og innen kosmetikk brukes den som tilsetning i hudkremer og andre estetiske produkter. I tillegg undersøkes Sukkertare potensiale som en UV-beskyttende komponent [14]. I tillegg til Butare og Sukkertare er *Chorda filum* (Martaum), *Ascophyllum nodosum* (Grisetang) og *Fucus serratus* (Sagtang) vanlige brunalger langs kysten.



Figur 2 Sukkertare. Brunalge med bølgede blader og en gulaktig farge [15].

Martaum har lange blader som kan minne om tynne snorer. Bladene er glatte og uforgreinet, og kan bli så lang som 8 meter. Disse bladene er omtrent 5 mm tykke i diameter. Martaumplanter har en levetid på ett år, og forsvinner helt om vinteren. Plantene trives best i skjermede områder som sund og bukter langs kysten, og fester seg ofte i små steiner og skjell [16]. Grisatang, har en læraktig konsistens og består av gulbrune skudd med ovalformede luftblærer som går ut fra en flat festeskive. Typisk for Grisetangen er at den blir mellom en halv meter og to meter lang, og plantene kan bli flere tiår gamle. Arten fester seg til steiner og berg langs kysten i en rekke habitater, og er kanskje den mest fremtredende arten langs norskekysten [17, 18]. Sagtang er en av de mest vanlige brunalgene, og kan bli inntil en meter lange. Plantene er kraftige og olivenbrun i fargen. De er flate og har båndformede skudd som er grovt sagtannet i kantene. Sagtang vokser på fjellgrunner og finnes langs hele kystlinjen [19].

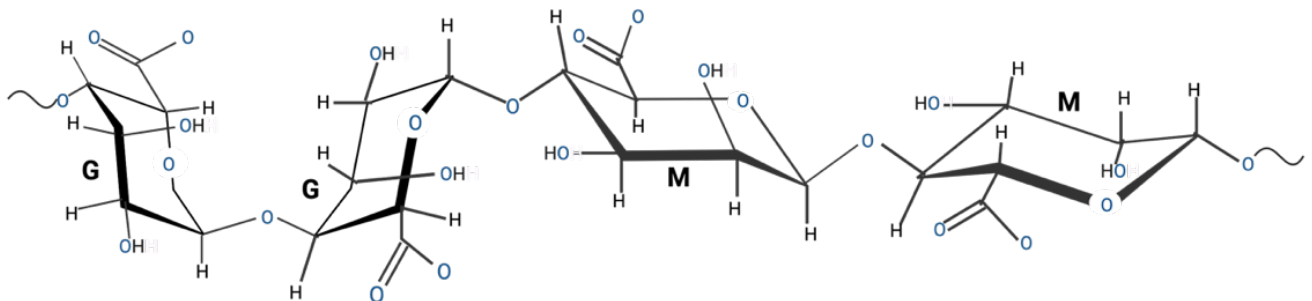
2.2. MARINE POLYSAKKARIDER OG SUKKERALKOHOLER

Polysakkarider er en klasse av karbohydrater som består av minst ti monosakkarider koblet sammen gjennom glykosidbindinger, og kan både forekomme som forgrenede og lineære strukturer [25]. Planter regnes som primærprodusenter av organiske karbonforbindelser, og har derav et stort karbohydratinnhold. I marine makroalger er store deler av karbohydratinnholdet polysakkarider som alginat, laminaran og fucoidan, og er spesielt lokalisert i celleveggene. Disse polysakkaridene er de viktigste kjemiske forbindelsene som produseres gjennom fotosyntese i brunalger, og det skilles mellom lagringspolysakkarider og strukturelle polysakkarider [26].

I tare har polysakkarider både strukturelle og fysiologiske funksjoner, hvor den strukturelle funksjonen er å gi struktur til cellene i celleveggen til plantene, celle-celle gjenkjenning, stimulering av plantens immunsystem og hydrering. Fysiologiske funksjoner er relatert til deres kjemiske og fysiske egenskaper som løselighet, viskositet, hydrering og ionebytteregenskaper. Polysakkaridene i tare har en svært høy affinitet til vann, som gjør at de kan binde seg til vann som er flere ganger deres egenvekt. På grunn av denne egenskapen regnes polysakkaridene i tare som hydrokollider, og gir de egenskaper som lar de fungere som stabilisatorer, emulgatorer, filmdannende og viskositet modifierende midler [27].

2.2.1. STRUKTUR OG BRUKSOMRÅDER FOR ALGINAT

Alginat er et strukturelt polysakkarid funnet i celleveggen til makroalger. Alginat produseres både av tare og bakterier, men for kommersielt bruk er det kun mulig å isolere fra brunalger. Polysakkaridet er et lineært polyanion bestående av mellom 50 og 200 000 enheter av monomere β -D-mannuronsyre (M) og α -L-guluronsyre (G), hvor alginatmolekylene knyttes sammen via β - (1 \rightarrow 4) glykosidiske bindinger (**Figur 3**) [28, 29].



Figur 3 Den kjemiske strukturen til alginat er bygget opp av 50 – 200 000 enheter av β -D-mannuronsyre (M) og α -L- guluronsyre (G)

Ved tilsats av divalente kationer som Ca^{2+} vil alginat ha kapasitet til å absorbere 200-300 ganger sin egenvekt med vann, og vil bil til en viskøs gel [31]. Alginat har både geldannende, stabiliserende og fortykkende egenskaper som er varierende med variasjonene av rekkefølgen og sammensetningen av M og G. På grunn av disse egenskapene blir alginat brukt mye i matindustrien blant annet for å opprettholde strukturen i frossen mat og som tilsetning i salatdressing. I tillegg er alginat et av de mest brukte bindestoffet i tekstilfarging, og brukes for innkapsling av spermier ved kunstig befruktning av husdyr og som tannavtrykksmaterialer [28, 32].

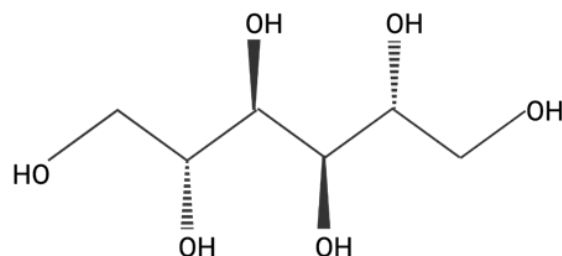
2.2.2. STRUKTUR OG BRUKSOMRÅDER FOR FUCOIDAN

Fucoidan er et sulfatert polysakkarid ofte isolert fra brunalger, som har fått mye oppmerksomhet innen forskning på grunn av sin bioaktivitet [28]. Fucoidan har en varierende sukkerkomposisjon, bindingstyper, sidekjeder og substituenten, og det er derfor svært komplisert å finne eksakt kjemisk struktur for polysakkaridet. Store deler av den totale mengden fucoidan fra alger er sulfaterte polyanion, og består av et lineært kjede av tilfeldige 1→3 eller 1→4 bundet α -L-fucopyranose-rester som med jevne mellomrom erstattes med andre monosakkarider [33].

På grunn av for lite informasjon om den strukturelle oppbyggingen og funksjonene til fucoidan er det ikke store kommersielle bruksområder for stoffet i dag. Det har derimot blitt rapporter om bruk iblant annet kosmetikk og mat. I tillegg har fucoidan blitt brukt innenfor medisin, og det forskes på bruk av fucoidan i kreftbehandling [28]. I biologiske anvendelser legges det vekt på strukturen og sulfatinnholdet i fucoidan, og i mat og kosmetikk er bioaktiviteten svært viktig [28, 30].

2.2.3. STRUKTUR OG BRUKSOMRÅDER FOR MANNITOL

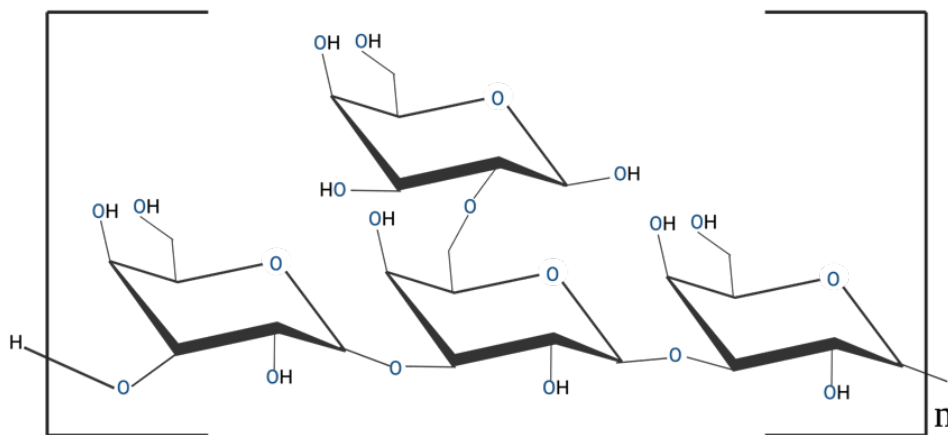
Mannitol er et monomerisk seksverdig sukkeralkohol som finnes naturlig i planteriket, og produseres gjennom fotosyntesen. Den strukturelle oppbyggingen av mannitol er vist i **Figur 4**. Mannitol finnes i alle brunalger og kan utgjøre over 30% av algens tørrvekt avhengig av høstetidspunkt [34]. Mannitol har fuktighetsgivende effekt og antioksidantegenskaper, og brukes i kosmetiske og farmasøytiske produkter. Innen medisin benyttes mannitol for å senke intraokulært og intrakranielt trykk ved skader. Mannitol brukes også som søtningsmiddel i mat, da mannitol har en søt smak samtidig som kaloriinnholdet er lavt [35, 36].



Figur 4 Strukturell oppbygging av mannitol [37].

2.2.4. STRUKTUR OG BRUKSOMRÅDER FOR LAMINARAN

Laminaran er et polymerisk lagringsglukan som er lagret i kloroplastene i cellene til brunalger, og kan utgjøre over 30% av algenes tørrvekt. Polysakkaridet finnes i alle brunalger, hvor det blir produsert gjennom fotosyntesen. Laminaran består av 20-25 enheter av β - (1 \rightarrow 3)-D-glukan med β (1 \rightarrow 6)-bindinger, og er et lineært polysakkarid (**Figur 5**) [38]. Laminaran er et vannløselig polysakkarid som blant annet bidrar til kostfiberinntak og er kreftforebyggende, og det har blitt rapportert om bruk av laminaran innenfor biokjemi og medisin [39]. I likhet med fucoidan, er ikke bruken av laminaran like utbredt som alginat.



Figur 5 Strukturell oppbygging av laminaran [40].

2.3. MIKROBIOM

Mikrobiomer er samlinger av alle genom og gener av mikroorganismer som lever på den indre og ytre overflaten på alle eukaryote organismer, og er dermed en del av alle økosystemer. Med andre ord er mikrobiom et samfunn av mikrober som deler et felles miljø og er avgrenset av et hulrom i en organisme eller en overflate av væsker og avføring. Disse mikroorganismene lever sammen på en av tre måter. De kan være symbionter, som vil si at alle organismene i miljøet tar nytte av at de andre organismene er til stede (symbiose). Motsetningen til symbiose er parasittisme. Parasitter er organismer som skaper en ubalanse i det mikrobiologiske samfunnet eller som er til direkte skade for vertsorganismen i form av sykdom. Mikroorganismer kan også leve sammen som kommensale. I kommensale samfunn vil mikroorganismene leve i en form for symbiose, noen av mikroorganismene har nytte av at de andre organismene er til stede, mens andre ikke vil ha noen påvirkning av at det er andre mikroorganismer til stede [41].

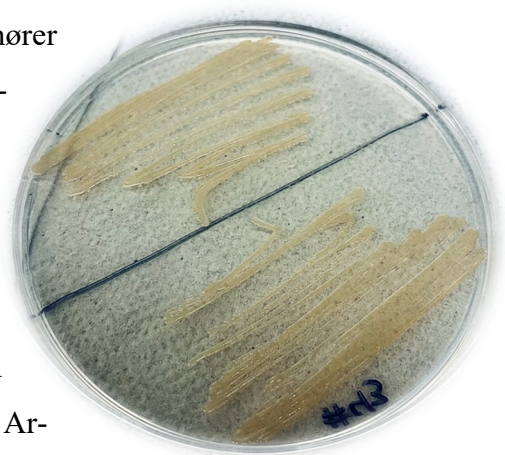
2.3.1. ULIKE MARINE BAKTERIER OG DERES KARAKTERISTIKA

Flavobacteriaceae er en den største familien i klassen *Flavobacteriia*, og inneholder 90 forskjellige slekter og hundrevis av arter. Disse artene har veldig forskjellige fysiologiske egenskaper og finnes i varierende miljøer. Noen er forbundet med sjøvann, andre med jord og noen er assosiert med dyr, mennesker og planter. Innenfor *Flavobacteriaceae* finner man blant annet slektene *Algibacter*, *Olleya*, *Lacinutrix*, *Flavobacterium* og *Cellulophaga* [42]. De marine slektene i *Flavobacteriaceae* er en viktig komponent i makroalger sin fotosyntese, og er ansvarlig for en stor del av remineraliseringen av organisk materiale i havene. Disse artene produserer pigmenter som strekker seg fra lys gul til dyp oransje. Pigmenteringen er ofte forårsaket av karotenoidpigmenter i cytoplasmaet hos bakteriene. Stort sett er de marine artene i *Flavobacteriaceae* tilpasset kaldt saltvann, har optimal dyrkningstemperatur mellom 20 og 25°C, og krever vanligvis natrium for å overleve. Artenes evne til enzymatisk nedbrytning av makromolekyler varierer ofte med habitatet de lever i og hvilke biopolymere som er tilgjengelig. Mange marine bakterier produserer enzymer som bryter ned marine polysakkarider fra alger, som agar, laminaran og fucoidan [42].

Pseudoalteromonadaceae som tilhører klassen *Gammaproteobacteria* er en liten familie bestående av 3 slekter, blant annet slekten *Pseudoalteromonas*. Artene krever natriumioner for å utvikle seg og er svært tilpasningsdyktig til ulike habitater. De marine artene som tilhører *Pseudoalteromonas* har en viktig rolle i marine miljøer, og de har blitt isolert både fra områder nær kysten, i åpne og dype havvann og fra marine alger. Artene grupperes gjerne i to, de pigmenterte og de ikke-pigmenterte, hvor de pigmenterte ofte har et bredt spekter av biologisk aktive forbindelser, mens ikke-pigmenterte arter har en tendens til å ha et bredt spekter av degraderende enzymaktivitet og er mer tilpasningsdyktig. De pigmenterte artene varierer stort i farge, og kan ha kolonier som er hvit, gul, oransje, rød, beige og blå [43].

Familiene *Vibrionaceae* og *Oceanospirillaceae* har også arter som har blitt isolert fra marine miljøer og karakterisert. Enkelte arter av *Vibrionaceae* kan forårsake infeksjoner hos både mennesker og dyr, og er isolert fra en rekke ulike miljøer. Et eksempel er slekten *Vibrio* som ofte har upigmenterte kolonier på agar [44]. *Oceanospirillaceae* inneholder blant annet slekten *Marinomonas* som vokser ved temperaturer mellom 0 og 37°C, og er avhengig av natriumioner for å være levedyktige [45].

Familiene *Alteromonadaceae* og *Shewanellaceae* tilhører klassen *Gammaproteobacteria*. *Alteromonadaceae* består for det meste av marine bakterier, blant annet slekten *Paraglaciicola*. Artene i slekten *Paraglaciicola* har ofte kolonier som er hvitpigmenterte, men kan også ha en rosaaktig eller kremaktig farge [46]. Familien *Shewanellaceae* består kun av slekten *Shewanella* (**Figur 6**) som har optimal vekst ved 4°C. Artene er ofte isolert fra marine miljøer, og er kjent for å degradere gelatin. Noen av artene i slekten *Shewanella* har vist seg å være sykdomsfremkallende, og kan forårsake infeksjoner både hos mennesker, dyr og planter. Grunnet at disse artene akkumulerer cytokrom vil kolonier på agar fremstå som beige eller lys rosa i fargen [47].



Figur 6 *Shewanella baltica* på Marine Broth agar.

Rhodobacteraceae som tilhører klassen *Alphaproteobacteria* og *Cyclobacteriaceae* som tilhører klassen *Cytophagia* er også familier som er kjent for å inneholde marine bakterier. Arter fra familien *Rhodobacteraceae* har blitt isolert fra en rekke marine habitater, som sjøvann, elvemunninger, sedimenter og algeoverflater. Til sammen er det hundre slekter som er anerkjent som medlem av *Rhodobacteraceae*, hvor slekten *Sulfitobacter* er en av dem [48]. *Cyclobacteriaceae* inneholder derimot kun 14 slekter, blant annet *Algoriphagus*. Disse slektene er kjent for å ha et bredt spekter av morfologiske egenskaper, som størrelse, farge, form og mobilitet. De har i likhet med artene i *Rhodobacteraceae* blitt isolert fra ulike marine miljøer som alger, marine sedimenter og varme kilder. Noen av artene i familien *Cyclobacteriaceae* er kjent for å bryte ned en rekke makromolekyler og polysakkarider. Ved vekst på agar vil kolonier fra slekten *Algoriphagus* ha en rosa, nesten oransje farge, og vil være konvekse, skinnende og sirkulære kolonier [48].

2.3.2. POLYSAKKARID-DEGRADERENDE BAKTERIER FRA TARE

Marine bakterier er verdifulle kilder for isolering av enzymer som spesialiserer seg på nedbryting av ulike polysakkarider fra brune, røde og grønne makroalger. Disse bakterier er nøkkelspillere i den globale karbonsyklusen og i resirkulering av algebiomassen, og har derfor i de siste årene fått en økt viktighet innen bioteknologi og biomasseutnyttelse [49].

De siste 15 årene har interessen for glykosidaser og polysakkarid lyaser i forbindelse med makroalgepolysakkarider eskalert [49]. Glykosidaser er enzymer som katalyserer hydrolysen av glykosidiske bindinger og frigjør sakkaridforbindelser [50], og polysakkarid lyaser er enzymer som bryter ned uronsyrer (aldehydkarboksylsyrer) som inneholder polysakkarider ved hjelp av β -elimineringmekanismer [51]. Noen polysakkarid lyaser som alginat lyase bryter også glykosidbindinger. Disse enzymene utgjør enten nye underklasser innenfor kjente karbohydrataktive enzymer (CAZy) som for eksempel *l*-karragenaser og β -porfyranaser, eller nye CAZy-familier som γ -karrafeenaser, α -agaraser og fucoidanaser. De fleste av disse enzymene har blitt isolert fra tare-assosierte bakterier [49].

Metagenomiske studier av marine miljøer gir muligheten til å oppdage nye enzymer, enten gjennom datautvinning eller gjennom aktivitetsscreening av metagenomiske biblioteker.

Per nå har ikke metagenomiske undersøkelser gitt resultater som indikerer at bakterieplankton sjeldent inneholder Macroalgal-polysaccharide-degrading enzymes (MAPD-enzymmer). Som en motsetning antas det at tare-assosiert bakterier ofte har slike enzymer, ettersom de fleste MAPD enzymene vi kjenner til i dag har blitt isolert fra disse bakterier [49].

Ved Universitetet i Bergen ble det i 2011 gjennomført en studie hvor det ble brukt en berikelsesstilnærming for å identifisere bakteriepopulasjoner assosiert med taren *Laminaria hyperborea*. Forsøket ble gjennomført ved å anrike med tarederiverte karbonkilder, for så å se om bakteriene brøt ned disse karbonkildene. De benyttet seg av Marine Broth tilsatt mannitol, laminaran, alginat eller fucoidan. Biofilmsuspensjonene isolert fra taren ble sådd ut på de forskjellige mediene og inkubert ved 15 grader. Resultatene av studiet viste til at forskjellige medlemmer av *Alphaproteobacteria* og *Gammaproteobacteria* var involvert i nedbryning av tareproduserte biomasser [52].

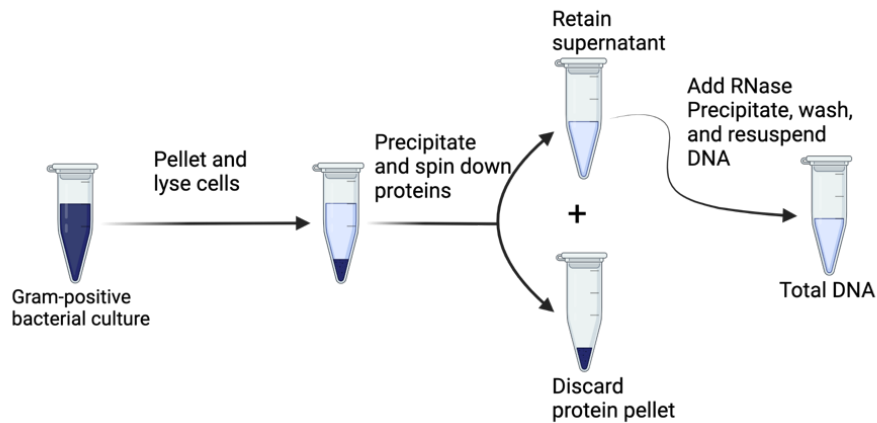
Et annet studie utført av universiteter i Belgia og Frankrike undersøkte i 2014 polysakkaridaktiviteten til den dyrkbare bakterielle populasjonen assosiert med tarearten Grisatang. Bakteri-isolatene høstet fra planten ble dyrket i Marine Broth tilsatt ulike algepolysakkarider i tillegg til et modifisert medium med alginatsalter. Etter dyrkingen ble kulturene studert, og bakterier som viste hydrolytisk aktivitet ble på nytt testet for å bekrefte aktiviteten. 324 bakterier ble taksonomisk identifisert og fordelt på 35 forskjellige slekter og 18 ulike familier. Av disse hadde slektene *Marinomonas*, *Cellulophaga* og *Pseudoalteromonas* høyest representantantall. Fra de 324 identifiserte bakteriene ble 78 isolater funnet til å ha en positiv effekt på minst ett algepolysakkarid (agar, ι - eller κ -karragen, og alginat) [49].

2.4. RELEVANTE METODER FOR IDENTIFISERING AV BAKTERIER OG BIOAKTIVITET

2.4.1. ISOLERING AV GENOMISK DNA FRA MIKROORGANISMER

DNA (deoksyribonukleinsyre) er nukleinsyrer som finnes i alle levende celler, og har som hovedfunksjonen å bære den genetiske informasjonen til en celle. 16S ribosomal DNA (16S rDNA) er genet som koder for 16S rRNA som er en liten del av ribosomet til prokaryote celler [53]. Analyser av 16S rDNA har blitt en standardmetode for identifikasjon og klassifisering av bakterier, da informasjon om 16S rDNA-sekvensen i kombinasjon med en enorm sekvensdatabase gjør det enkelt å tildele bakteriene en fylogenetisk plassering. Den fylogenetiske plasseringen vil videre åpne opp for nøyaktig identifisering av bakterieisolater og oppdagelsen av nye bakterier [54].

For å kunne amplifisere og sekvensere DNA, må det først isoleres fra organismen. Det finnes flere prosedyrer for å isolere DNA, hvor prosedyrene er avhengig av hvilken type celle/vev DNAet skal isoleres fra og hva DNAet skal benyttes til videre. Prosedyrene som benyttes i dag er unntaksvis basert på ferdige kit (**Figur 7**).



Figur 7 Prosedyre for isolering av DNA ved bruk av MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit som er designet for DNA-isolasjon fra gram positive eller negative bakterier. Fra en bakteriekultur kan DNA isoleres ved å lysere cellene i kulturen, for så å felle ut proteiner og RNA ved organisk separasjon slik at det kan separeres fra DNAet. [55]

DNA til prokaryote organismer ligger innkapslet i cytoplasmaet sammen med proteiner og RNA. Cytoplasmaet ligger igjen innenfor cellevegger som er omringet av en ytre cellemembran. For å få tilgang på DNAet må derfor cellemembranen og celleveggen ødelegges. Dette kan gjøres ved å spalte karbohydratene som finnes i celleveggene. Siden cytoplasmaet inneholder RNA og proteiner i tillegg til DNA, må DNA skilles fra disse makromolekylene ved å tilsette proteaser og RNaser, for så å bruke etanol og isopropanol til å felle ut DNAet. Ved sentrifugering vil pelleten bestå av DNA, og supernatanten av RNA og proteiner [56, 57].

2.4.2. DENOVIX DS-11 SERIES SPECTHROPHOTOMETER, MÅLING AV DNA-KONSENTRASJON

DeNovix spektrofotometeret gir fullspektret UV-Vis-analyser og kan måle fluorescens, noe som gjør det mulig å foreta raske kvantifiseringer av nukleinsyrer og proteiner. Siden nukleotider som RNA, dsDNA (double strain DNA) og ssDNA (single strain DNA) alle absorberer ved 260nm, vil alle nukleotidene i en prøve påvirke den totale absorbansen, og det er derfor nødvendig å rense prøvene før målinger. Instrumentet har kapasitet til å kvantifisere helt ned til en konsentrasjon på 0,5 pg/μl for dsDNA, i tillegg til at DeNovix spektrofotometeret måler renheten av nukleinsyren i prøven [58].

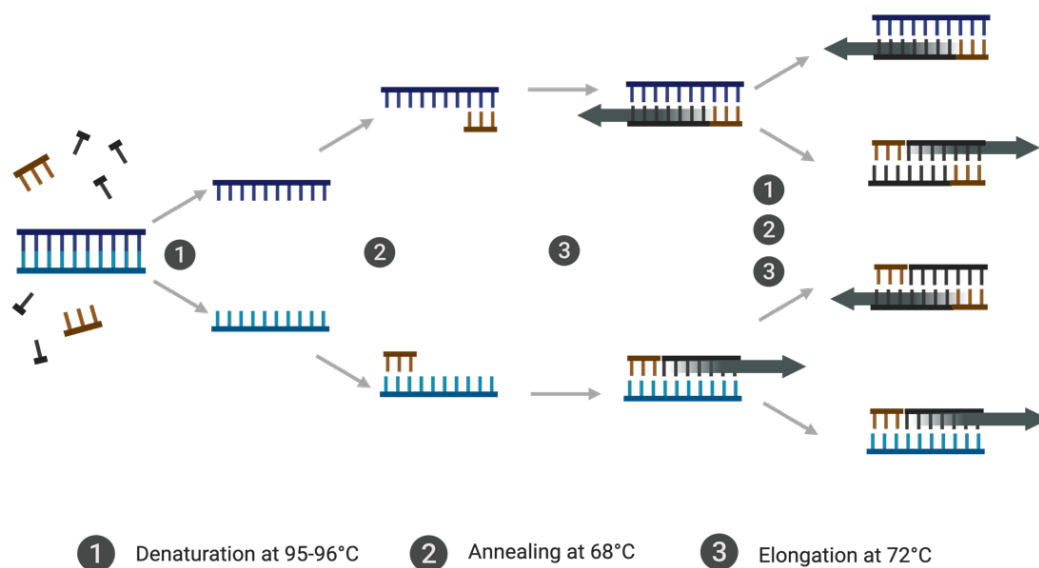
Renhetsverdien til prøvene som analyseres oppgis i en 260nm/280nm og 260nm/230nm ratio. 260/280 er et mål på forholdet mellom absorbansen målt ved 260 og 280 nm, og brukes til å vurdere renheten til DNA og RNA. Her er forhold høyere enn 1,8 generelt akseptert som rene

DNA-prøver og forhold på rundt 2,0 er akseptert som rent RNA. Forholdet lavere enn 1,8 for DNA og 2,0 for RNA kan indikere tilstedeværelse av proteiner, fenol eller andre forurensninger som absorberes ved 280 nm. 260/230 ratioen er forholdet mellom absorbansen målt ved 260 nm og 230nm, og brukes som et sekundærmål på nukleinsyrerenhet. Denne verdien er ofte høyere enn ved 260/280, og ligger vanligvis mellom 2,0 og 2,2. Dersom forholdet er lavere enn 2,0, er dette en indikasjon på tilstedeværelsen av uønskede stoffer som absorberes ved 230 nm [59].

2.4.3. AMPLIFISERING AV 16S rDNA

Polymerase kjedereaksjon (PCR) er en metode for amplifisering av en organismes DNA eller RNA. Prinsippet baserer seg på at det oppstår en kjedereaksjon hvor mengden av en DNA-sekvens økes eksponentielt ved en konstant endring av temperatur. Det som skjer under en slik reaksjon, er det samme som skjer ved celledeling. Dobbelheliksen av DNAet denatureres, slik at begge enkelttrådene kan fungere som maler for dannelse av nye tråder, hvor enzymet DNA-polymerase hjelper til med syntetiseringen. Primere legger til nukleotider som er identiske til templat-DNA slik at dattercellene blir identiske med modercellen. Hovedstadiene av PCR består av fire stadier. I første steg denatureres DNA-tråden ved oppvarming. I steg to vil templat-DNA avkjøles, og det vil bli bundet primer til enkelttrådene som angir startpunktet av amplifiseringen. I trinn tre vil templat-DNA igjen varmes opp og det vil oppstå en syntetisering av et nytt dobbeltrådet DNA ved at primeren legger til nukleotider på enkelttrådene. I det fjerde og siste steget vil det syntetiserte DNAet denatureres før trinnene gjentas (**Figur 8**) [60].

Polymerase chain reaction - PCR

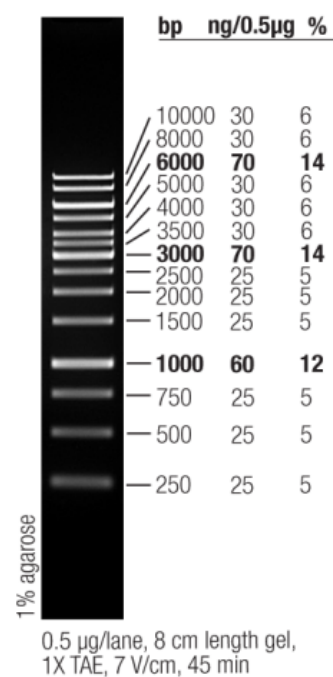


Figur 8 Stegene i en polymerase kjedereaksjon ved bruk av primer (brun) og DNA-Polymerase (grå). (1) Templat-DNA denatureres. (2) En primer fester seg til DNA-trådene og angir startpunktet av amplifiseringen. (3) Syntetisering av nye DNA-tråder ved at polymerasen legger til nye nukleotider [61].

2.4.4. SEPERASJON AV MAKROMOLEKYLER MED GELELEKTROFORESE

Gelelektroforese er en metode hvor makromolekyler blir separert fra hverandre basert på størrelse og ladning ved å kjøre strøm gjennom en gel hvor prøven med makromolekylene er påsatt. Gelen som benyttes kan både være av agarose og polyakrylamid. Basert på størrelse og ladning vil molekylene migrere gjennom gelen med ulik hastighet, og skilles fra hverandre [62]. Ved separasjon av nukleinsyrer, separeres molekylene etter økende størrelser.

Ved DNA elektroforese avsettes prøvene i brønnene nærmest den negative polen. DNA er negativt ladet og vil derfor vandre i retning den positive polen. Under DNA elektroforese benyttes det en ladder som består av DNA fragmenter med kjent størrelse (**Figur 9**), som kan benyttes for å sammenligne DNA fragmentene fra prøven. Ved en slik sammenligning kan en få synlig bekreftelse på et eventuelt ønsket produkt og kvantifisere prøve-DNA. Det finnes ulike



Figur 9 GeneRuler 1 kb DNA ladder med tilhørende DNA-fragmenter [63].

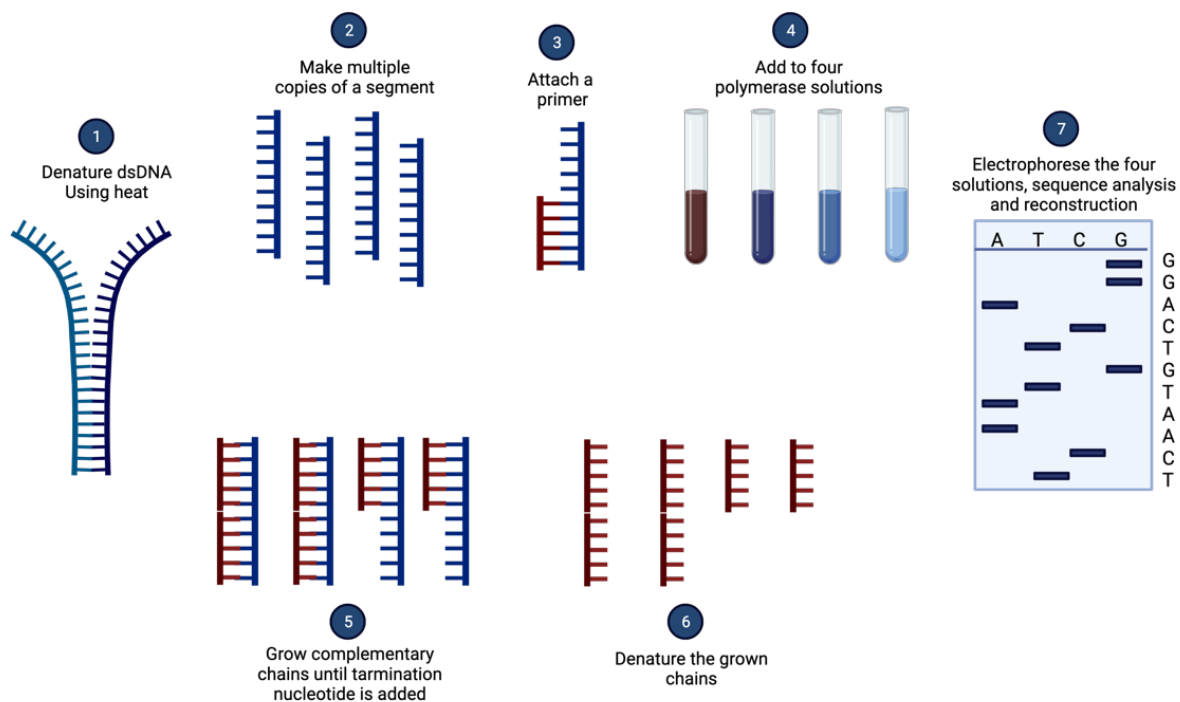
metoder for DNA elektroforese, horisontal elektroforese med agarosegel og Flashgel elektroforese [62]

2.4.5. ARTSBESTEMMELSE VED SEKVENSERING AV 16S rDNA

DNA-sekvensering er ulike metoder som benyttes for å kunne lese av rekkefølgen på baseparene i DNA og i den forbindelse få tilgang til organismens genetiske kode. I dag finnes de flere sekvenseringsteknikker, og hvilken metode som blir benyttet er avhengig av hva resultatet av sekvenseringen skal benyttes til. Sekvenseringsmetodene skilles gjerne i første-, andre- og tredje generasjons sekvensering. Førstegenerasjons sekvensering inkluderer blant annet Sanger-sekvensering, også kalt kjedeterminerings-metoden, som er den mest brukte sekvenseringsmetoden [64].

Sanger-sekvensering er en målrettet sekvenseringsteknikk som bruker enzymet DNA-polymerase. Under Sanger-sekvensering vil en radioaktivt merket DNA-primer (oligonukleotidprimer) hybridiseres med et denaturert templat-DNA i et rør som inneholder de fire deoksyribonukleotidene (dATP, dTTP, dGTP og dCTP) og DNA-polymerase. DNA-polymerasen kopierer trådene, og vil starte kopieringen i 3'-enden av primeren. Dette er likt som under metoden beskrevet for PCR. Et analogt nukleotid, dideoksyribonukleotid (ddNTP), hvor sukkerets 3'-ende-karbon kun binder seg til et hydrogenatom i stede for en hydroksylgruppe tilsettes. Innsettingen av en ddNTP i DNA vil føre til en terminering av kjedeforlengelsen, da fosfodiesterbindinger med nye nukleotider ikke lenger kan dannes.

I metoden benyttes fire forskjellige rør, som hver inneholder DNA, primere og alle fire dNTP-ene. I tillegg er det tilsatt en liten mengde av de fire korresponderende ddNTP-ene. Polymerasen vil da sette inn ddNTP-ene tilfeldig, og en rekke fragmenter av varierende lengde oppstår. Videre vil alle fragmentene avsluttes av ddNTP, før det foretas en elektroforese hvor en polyakrylamidgel skiller fragmentene i henhold til størrelse. Disse fragmentene er radioaktivt merket og visualiseres på en røntgenfilm svartnet av stråling. Ved bruk av Sangers-metode kan sekvenser mellom 200 og 400 basepar sekvenseres i en enkelt reaksjonsprosess. Dette gjør at det ofte kreves flere sykluser for å sekvensere hele DNA-tråder. I slike tilfeller må overlappende sekvenser settes sammen som et puslespill. Metoden for Sanger-sekvensering er visualisert i **Figur 10** [60].



Figur 10 Viser metoden for Sanger-sekvensering i 7 steg. (1) dsDNA-fragmentet denatureres til to ssDNA-fragmenter. (2) Et fragment for ssDNA kopieres opp. (3) En primer som korresponderer til en ende av fragmentet festes til ssDNA. (4) Fragmentet tilsettes til fire polymeraseløsninger som hver inneholder fire typer dNTP og en type ddNTP. (5) Kjeden vokser frem til det analoge nukleotidet tilfeldig festes til ssDNAet. (6) dsDNAet som har blitt dannet denatureres for å få en serie med ssDNA i varierende lengder. (7) Fragmentene separeres ved elektroforese og sekvensene settes sammen og leses av [65].

2.4.6. UNDERSØKELSER AV BIOAKTIVITET OG VEKST VED BRUK AV HIGH THROUGHPUT SCREENING

High-throughput screening (HTS) er analysemetoder hvor automatiserte instrumenter benyttes for hurtig og automatisk teste et stort antall kjemiske eller biologiske forbindelser for biologisk aktivitet. HTS er kosteffektive analysemetoder som ofte benyttes i farmasøytiske og bioteknologiske selskaper for å identifisere forbindelser med spesifikke farmakologiske eller biologiske aktiviteter [66]. De automatiserte utstyret som blir benyttet ved HTS gjør det mulig å kultivere celler i nøye kontrollerte forhold hvor mange ulike variabler som pH, temperatur og karbonkilde registreres kontinuerlig. Dette krever en viss grad av parallellitet, og det er ofte nødvendig å kjøre mange eksperimenter parallelt for å få pålitelige resultater. Ved HTS kultivering av bakterier benyttes generelt brønnplater. Målinger av aktivitet og vekst blir automatisk gjennomført av instrumentene som benyttes, med kontinuerlig lagring av data [67].

BioLector fra m2p labs er mikrofermentorer som regnes som kan benyttes til HTS-bioprosesering. Instrumentet er basert på brønnplate format, og opererer med online og forhånds kalibrerte sensorer for måling av pH, temperatur fluorescens, oppløst oksygen (DO) og biomasse. I BioLectoren måles biomassen via «scattered light» med en eksitasjonsbølgelengde på 620 nm. Intensiteten til det samlede lyset vil da korrelere med biomassekonsentrasjonen i kulturene, og en økning av signalet fra lysintensiteten vil tilsi en økning i biomasse. Deteksjonen av lyset er avhengig av brønnvolumet i brønnplatene, type plate, mediekomponenter og partikkelstørrelse og form på mikroorganismene som kultiveres. BioLector er gjerne koblet opp mot programvaren BioLection som kontrollerer temperatur, ristehastighet og andre kultiveringsvariabler i kultiveringskammeret. Programmet vil i tillegg til å holde kontrollere dyrkningsvariablene også registrere og lagre all data som blir målt av instrumentet [68, 69].

3. MATERIALER OG METODE

3.1. MATERIALER

Tabell 1 og Tabell 2 henviser til instrumenter, utstyr og reagenser som ble benyttet under gjennomføringen av de praktiske forsøkene. Tabellene henviser i tillegg til forhandler og artikkelnummer til instrumentene og reagensene.

Tabell 1 Oppstilling av utstyr og instrumenter benyttet under gjennomføringen av oppgaven.

Utstyr	Forhandler	Artikkelnummer
Petriskåler	VWR	
Autoklav		
Sentrifuge	Eppendorf	
Mikropipetter (0-10 µL, 10-100 µL, 100-1000µL)	Eppendorf	
Vortex mikser	VWR	
DeNovix DS-11 FX	DeNovix	
SimpliAmp Thermal Cycler	ThermoFisher	
Elektroforesekammer	ThermoFisher	
Spenningskilde	BioRad	
ChemiDoc	BioRad	
Zymo-spin Column	Zymo Reasearch	C1003-250
Clone Manager		
Risteinkubator	New Brunswick	
Multikanal mikropipette	BioHit	
BioLector Pro	m2p labs	
BioLector 1	m2p labs	
BioLection		
Round Well Plate B (R48 well microtiter plate)	m2p labs	MTP-R48-B
Flower Well Plate B (F48 well microtiter plate)	m2p labs	MTP-F48-B
Forseglingsfolie	m2p labs	F-GP-10
Spektrofotometer, SpectraMax [®] ABS Plus	Molecular devices	

Tabell 2 Oppstilling av reagensene med tilhørende forhandler og artikkel som ble benyttet under gjennomføringen av oppgaven.

Reagens	Forhandler	Artikkelnummer
Marine Broth	BD Difco	279110
Bacteriological Agar	Oxoid	LP0011
Glycerol	VWR	24386.298
TE Buffer	Biosearch Technologies	SS000001-D3
Ready-Lyse Lysozyme	Biosearch Technologies	E0057-D1
Proteinase K (50 µg/µL)	Biosearch Technologies	SS000099-D2
Gram Positive Lysis Solution (2X)	Biosearch Technologies	SS000402-D4
MPC Protein Precipitation Reagent	Biosearch Technologies	SS000399-D2
RNase A (5 µg/µL)	Biosearch Technologies	SS000213-D2
Isopropanol	VWR	1.09634.2500P
Etanol (70%)	VWR	1.00983.5000
EB Buffer	Qiagen	19086
Q5 High-Fidelity 2X Mastermix	BioLabs	M04925
Primer 1, S-D-Bact-1492	Eurofins	H757
Primer 2, S-D-Bact-0011	Eurofins	H827
Nuclease Free Water	VWR	436912CP
Agarose	ThermoFisher	16500500
GelRed Nucleic Acid Gel Stain	Biotium	41001
TAE Buffer (1X)	VWR	K915-1.6L
Loading Buffer	ThermoFisher	10815015
GeneRuler 1kb DNA Ladder	ThermoFisher	SM0312
Binding Buffer	Zymo Research	D4003-1-L
DNA Wash Buffer	Zymo Research	D4003-2-48
Mannitol	Sigma Aldrich	M4125
Laminaran (l.hyp, 21.2.22)		
Alginat (L.hyp.blad, SF120RB S21777, n=1170 ml/g, 5/9-14)		
Fucoidan (10 mM HCl, 95°C, 8h, 10.3.2104, 0,1 mg nacl/mg)		

3.2. METODE

Fare- og sikkerhetssetninger for kjemikaliene brukt under forsøket er vist i **Vedlegg 9**, og risikovurdering av arbeidet er lagt ved i **Vedlegg 10**. Oversikt over isolatene brukt under oppgaven er gitt i **Tabell 1.1** i **Vedlegg 1**.

3.2.1. KULTIVERING AV BAKTERIER ISOLERT FRA TARE

Fra bakteriesamlingen fryst ned i 2020 ble det valgt ut 97 isolater for oppdyrking på agarskåler. Isolatene ble dyrket opp på autoklavert Marine Broth tilsatt agar [49,52]. Veieskjema er vist i **Vedlegg 2**.

Utvalgte isolater ble strøket ut på Marine Broth agar fra fryste glyserolampuller. Utstryk av plater ble gjennomført i sterilbenk. Platene ble inkubert ved 15 °C i tre dager sammen med en kontrollplate. Etter inkubasjon ble det gjennomført to runder med re-stryk fra de opprinnelige platene. Platene med re-stryk ble inkubert ved 15 °C i tre dager.

Ut fra de 97 isolatene ble det valgt ut 46 isolater som skilte seg ut basert på fenotype. Disse isolatene ble dyrket opp i flytende Marine Broth, veieskjema er vist i **Vedlegg 2**. Mediet ble autoklavert ved 120 °C i 20 minutter og avkjølt til romtemperatur. Sterilt Marine Broth ble fordelt i sterile rør (10% av totalt rørvolum). Rørene ble inokulert ved å pøde kolonier fra agarplatene over i rørene. Kulturene ble inkubert ved 15 °C i tre dager sammen med en negativ kontroll.

Etter tre dager ble det laget glyserolampuller (20% glyserol) fra de 46 kulturene. Ampullene ble fryst ned ved -80 °C.

3.2.2. ISOLERING AV GENOMISK DNA, PCR OG RENHETSMÅLINGER

ISOLERING AV GENOMISK DNA

For isoleringen av DNA ble protokoll og løsninger fra «MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit» fra Biosearch Technologies benyttet [55]. Protokoll er vedlagt i **Vedlegg 8**.

Fra kulturene dyrket i **Del 3.2.1.**, ble kulturer fra hvert isolat sentrifugert ved 14 000 rpm i 10 minutter. Supernatanten ble kastet, og pelletene ble re-suspendert i TE Buffer. Prøvene ble tilsatt Ready-Lyse Lysozyme og inkubert ved 37 °C over natt.

Prøvene ble tilsatt en mikstur av Proteinase K og Lysis Solution og inkubert ved 65 °C i 15 minutter og vortexet hvert 5 minutt. Rørene ble avkjølt til 37 °C og satt på is i 3 minutter. Videre ble MPC Protein Precipitation Reagent tilsatt i hver prøve og prøvene ble sentrifugert. Supernatanten ble tatt vare på og tilsatt RNase A. Rørene ble inkubert i 30 minutter ved 37 °C før det ble tilsatt isopropanol til hver prøve med DNA. Rørene ble så sentrifugert ved 4 °C og 14 000 rotasjoner per minutt (rpm) i 10 minutter. Supernatanten ble fjernet og pellet renses med etanol og på nytt sentrifugert. Etanolen ble fjernet, og pellet ble re-suspendert i EB Buffer.

DNA konsentrasjonen til alle prøvene ble målt av DeNovix DS-11 FX. Programmet som ble brukt var «dsDNA», og EB buffer (1 µl) ble brukt for å nullstille instrumentet. Prøvene (1 µL) ble etter tur pipettert over i prøvekompartimentet. Konsentrasjonen og renheten av DNA ble målt og notert.

PCR – AMPLIFISERING AV 16S rDNA

For amplifisering av 16S rDNA ble det tatt utgangspunkt i protokollen «Expand High Fidelity PCR System» fra Roche [70] og instrumentet SimpliAmp Thermal Cycler fra Thermo Fisher (**Figur 11**). Protokoll er vedlagt i **Vedlegg 8**.



Figur 11 SimpliAmp Thermal Cycler fra Thermo Fisher.

Amplifisering av 16S rDNA ble gjennomført for alle DNA-isolatene. I den forbindelse ble det laget en mastermikstur av Q5 High-Fidelity 2X Mastermix (25 μL /prøve), Primer 1 (2,5 μL /prøve), Primer 2 (2,5 μL /prøve) og Nuclease Free Water (19 μL /prøve). Mastermiksturen (49 μL /prøve) ble pipettert over i PCR-rør med isolert DNA (1 μL). Prøvene ble spinnert ned og amplifisert. Programmet brukt for amplifiseringen er vist i **Tabell 3**.

Tabell 3 Innstillinger kjørt under PCR. Viser antall sykluser for hvert trinn, temperatur og tid.

Sykluser	Grader [°C]	Tid [s]
1	98	30
35	98	10
	55	30
	72	45
1	72	120
1	4	Infinity

HORISONTAL DNA-ELEKTROFORESE

For støpning av agarosegel ble en ferdig løsning av agarose (0,8%) med GelRed i 1x TAE buffer benyttet. Støpekommeret ble plassert i elektroforesekommeret og fylt med TAE-Buffer. Kammene for oppdeling av brønner ble plassert i støpekommeret før det ble fylt med agarose-løsning. Når gelen var stivnet ble kammene fjernet fra gelen, og det ble laget en mastermikstur av Nuclease Free Water (10 µL/prøve) og Loadingbuffer (2 µL/prøve). For hver prøve ble mastermikstur (12 µL) blandet med DNA (1 µL). Prøvene ble deretter påsatt hver sin brønn, i tillegg til at det i en av brønnene ble påsatt Ladder (GeneRuler 1kb DNA Ladder, 2 µL) [71]. Spenningskilden ble innstilt på 90 V, og elektroforesetiden var omtrent en time. Gelene ble dokumentert ved fotografering i ChemiDoc fra BioRad.

RENSING AV 16S rDNA ETTER PCR

Før PCR produktene kunne benyttes til videre analyser måtte prøvene renses for å fjerne uønskede salter. Til rensingen ble løsninger og protokoll som tilhørte «DNA Clean and Concentrator™-5» fra ZYMO Research benyttet [72]. Protokoll er vedlagt i **Vedlegg 8**.

PCR produktet (50 µL) fra alle isolatene ble overført til Eppendorf sentrifugerør, som i tillegg ble tilsatt Binding Buffer. Rørene ble vortexet lett før innholdet i rørene ble overført til hver sin Zymo-spin™ column som ble plassert i oppsamlingsrør. Rørene ble sentrifugert i 30 sekunder, og oppsamlingsrørene ble tømt. DNA Wash Buffer ble tilsatt til kolonnene før rørene på nytt ble sentrifugert. Oppsamlingsrørene ble tømt, og Nuclease Free Water ble pipettert direkte på kolonnene. Kolonnene ble plassert i hvert sitt Eppendorf sentrifugerør og sentrifugert i 30 sekunder. Kolonnene ble fjernet og rørene med rensset PCR produkt ble oppbevart i kjøleskap.

3.2.3. SANGER-SEKVENSERING AV 16S rDNA

Sekvensering av 16S rDNA fra bakterieisolatene ble utført av Eurofins.

Før prøvene kunne sendes til Eurofins ble konsentrasjonen av DNA på nytt målt. Prosedyren benyttet var lik den beskrevet i **Del 3.2.2.**, sett bort fra at Nuclease Free Water ble benyttet som blank. Ut fra konsentrasjonene målt ble fortynningsforholdet til prøvene bestemt. I nye Eppendorf rør (2 rør per prøve) ble Nuclease Free Water (10 µL) blandet med rensset DNA (5 µL)

og Primer 1/primer 2 (2 μ L). Rørene ble merket med ID-merker fra Eurofins og sendt til Eurofins for utførelse av sekvensering [73].

Programmet Clone Manager ble benyttet for å lime sammen sekvenser fra sekvenseringene gjort av Eurofins. Ved sekvensanalyse i BLAST [74] ble bakterieisolatene tilegnet bakteriefamilier og slekter basert på prosentvis identitet til allerede logførte sekvenser i databasen.

3.2.4. KARBONKILDE-SCREENING I BIOLECTOR

I forkant av dette arbeidet ble resultatet fra sekvenseringen brukt til å plukke ut 29 bakterieisolater for karbonkilde-dyrkningen. Isolater som var kategorisert som klasse 2 organismer eller organismer med ukjent biosafety level (BSL) ble utelukket for videre arbeid.

Isolatene ble dyrket i forkulturer med Marine Broth som dyrkingsmedium, veieskjema er vist i **Vedlegg 2**. Isolatene ble inokulert i rør (50 mL) med Marine Broth (10% av totalvolum). Forkulturene ble inkubert ved 20 °C og 200 rpm i 2 dager.

For dyrkning i mikrofermentor ble det benyttet to typer instrumenter, BioLector Pro og BioLector 1. BioLector 1 er vist i **Figur 12**.



Figur 12 BioLector 1 fra m2p labs brukt under prosjektet. BioLectoren er koblet opp mot en programvare hvor protokoller blir laget og alle målinger blir registrert.

Isolatene dyrket opp i forkultur ble alle dyrket i fem forskjellige medium, hvor fire medium besto av Marine Broth med tilsatser av ulike karbonkilder, laminaran, fucoidan, alginat og mannitol (2 g/L). Det siste dyrkingsmediet inneholdte kun Marine Broth. Isolatene ble dyrket

i 48 brønns brønnplater av typen R48 well microtiter plate eller F48 well microtiter plate For å få kjørt alle isolatene med to paralleller per medium, ble det til sammen inokulert 11 plater. I platene var 14 brønner fylt med kun Marine Broth og de andre 14 brønnene var fylt med Marine Broth tilsatt karbonkilde (2 g/L). Fire av brønnene i alle platene ble ikke inokulert, hvor to av brønnene kun inneholdte Marine Broth og to inneholdte Marine Broth med karbonkilde (kontroll). Brønnplateoppsettet for forsøket er vist i **Vedlegg 3**.

I sterilbenk ble halvparten av brønnene i platene fylt med Marine Broth (1295 μ L) og den andre halvdelen fylt med Marine Broth tilsatt karbonkilde (2 g/L, 1295 μ L). Brønnene ble inokulert med forkulturer (40 μ L) slik at det til sammen var fire brønner per isolat, to paralleller for hvert medium. Brønnplatene ble forsegllet med forseglingsfolie og dyrket i mikrofermentor ved 20°C og 700 RPM i sirka 48 timer. Underveis i dyrkingen ble biomassen i alle brønnene målt ved 15 minutters mellomrom ved gain 3, 5 og 7 (BioLector Pro) eller 20, 30 og 50 (BioLector 1).

Etter dyrkingen ble OD til alle brønnene målt, og det ble dannet vekstkurver av biomassemålingene.

4. RESULTATER OG DISKUSJON

4.1. KULTIVERING AV ISOLATER HØSTET FRA TARE

Ved oppdyrking av isolatene som ble høstet fra tare og fryst ned i 2020, vokste alle 97 isolatene opp på agarskåler med Marine Broth. Etter å ha blitt re-strøket tre ganger ble alle platene vurdert til å kun inneholde en type mikroorganisme. Det ble basert på fenotypisk karakterisering 46 utvalgte isolater, hvor hvert isolat skilte seg fra de andre i enten farge, størrelse eller andre utseendemessige faktorer. Bilder av agarplatene som ble benyttet under karakteriseringen presenteres først i **Del 4.3**, og Isolatoversikten er gitt i **Vedlegg 1**.

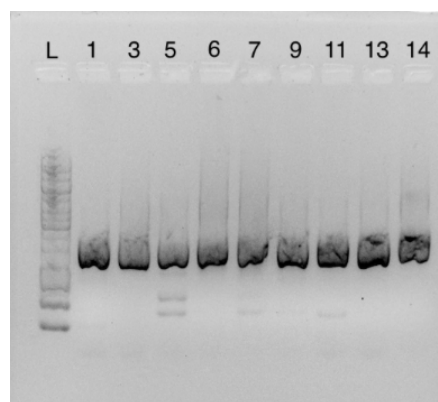
4.2. KONSENTRASJONSMÅLINGER AV GENOMISK DNA OG GELELEKTROFORESE

For å sikre høy nok konsentrasjon av DNA for videre analyser, ble konsentrasjonen av genomisk DNA målt etter gjennomført isolering. Konsentrasjonsmålinger på de utvalgte 46 isolatene (Vedlegg x) ble gjort ved bruk av DeNovix. Etter amplifisering av 16s rDNA ved PCR ble DNA fra isolatene påsatt agarosegel. Videre ble PCR-produktet rensset, og DNA-konsentrasjonen og renhetsgraden til DNAet målt på nytt ved hjelp av DeNovix. **Tabell 4.1** i **Vedlegg 4** viser konsentrasjonsmålingene gjort før PCR og etter rensingen av PCR produkt, sammen med målinger av renhetsgraden til DNAet, hvor renhetsgrad er et mål på mengde forurensing av proteiner og salter.

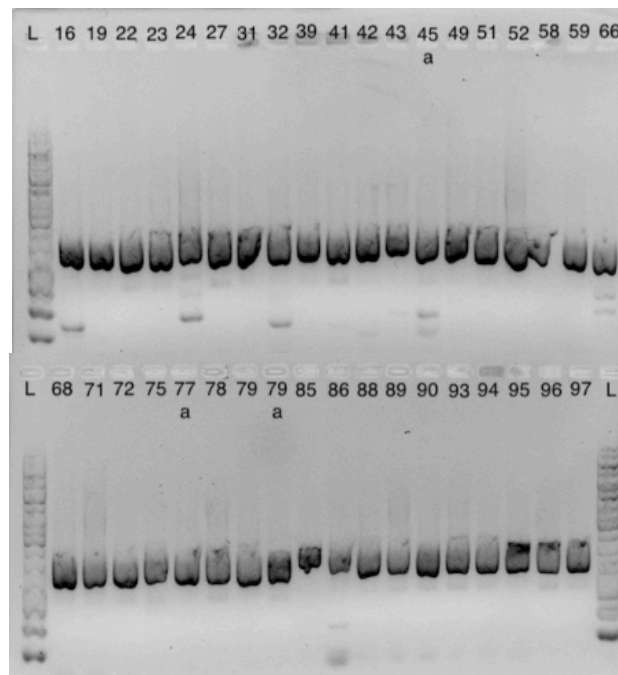
Etter isoleringen av genomisk DNA var konsentrasjonen for alle isolatene mellom 27,19 og 786,58 ng/ μ L, hvor de fleste isolatene hadde en konsentrasjon mellom 200 og 500 ng/ μ L. Renhetsverdiene gitt av absorbansforholdet 260/280 var høyere enn 1,8 [59] for en større andel av isolatene. Isolat nummer 7, 43, 66, 71 og 89 hadde tendenser til forurensning etter isolering med renhetsverdier på henholdsvis 1,78, 0,96, 1,77, 1,74 og 1,78. Verdiene til isolat 7, 66, 71 og 89 ble anslått til å ikke være kritiske, da verdiene for sekundærmålet (260/230) var innenfor grensene 2,0 – 2,2 [59]. Isolat 43 hadde derimot renhetsverdi med avvik på \sim 0,8. Sett sammen med konsentrasjonsmål (27,19 ng/ μ L) og absorbansveriden (0,54) for isolatet ble det antatt å være for lite DNA til stede i prøven. Etter rensing av PCR produkt var konsentrasjonen mellom 24,93 og 107,42 ng/ μ L for alle isolatene. De fleste isolatene hadde renhetsverdier mellom 2,0

og 2,2 [59] ved absorbansforholdet 260/230. Isolat 59, 66 og 68 hadde derimot verdiene 1,14, 1,59 og 1,53. I samråd med Laboratorieingeniør ble det anslått til å ikke være kritiske verdier, og sannsynligheten for forurensing ble antatt å være liten.

Figur 13 og **Figur 14** viser bilder av gelene fra kjøringen av gelelektroforese, hvor ladder ble påsatt brønnene helt til venstre i **Figur 13** og den øverste gelen i **Figur 14**. I den nedre gelen i **Figur 14** ble ladder påsatt i brønnen helt til venstre og høyre. Alle 46 isolatene ble kjørt på agarosegel. Isolatnummeret er vist i overkant av brønnene, og DNA båndene er de mørkeste og kraftigste båndene på gelene.



Figur 13 Agarosegel med 16s rDNA-fragmenter etter isolering av genomisk DNA og amplifisering. Fra venstre: GeneRuler 1kb DNA Ladder, isolat 1, 3, 4, 6, 7, 9, 11, 13, 14.



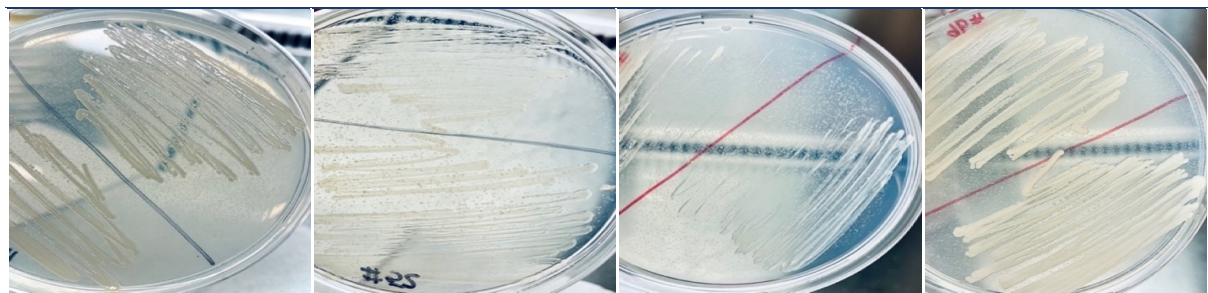
Figur 14 Agarosegel med 16s rDNA-fragmenter etter isolering av genomisk DNA og PCR. I den første gelen er GeneRuler 1kb DNA Ladder påsatt helt til venstre, sammen med 19 av isolatene. I den andre gelen er ladder påsatt både helt til venstre og høyre, og 18 av isolatene.

Sammenligning av DNA-bånd i **Figur 13** og **Figur 14** med **Figur 9**, viser til at DNA-fragmentene som ble isolert i **Del 3.2.2**, har lengder på ~1000 basepar [63]. Ideelt sett skulle båndene i **Figur 13** og **Figur 14** vært helt rette, men er her til dels hakkete. Ujevnheten i båndene kan både stamme fra agarosen brukt i gelen og vandringsbufferen.

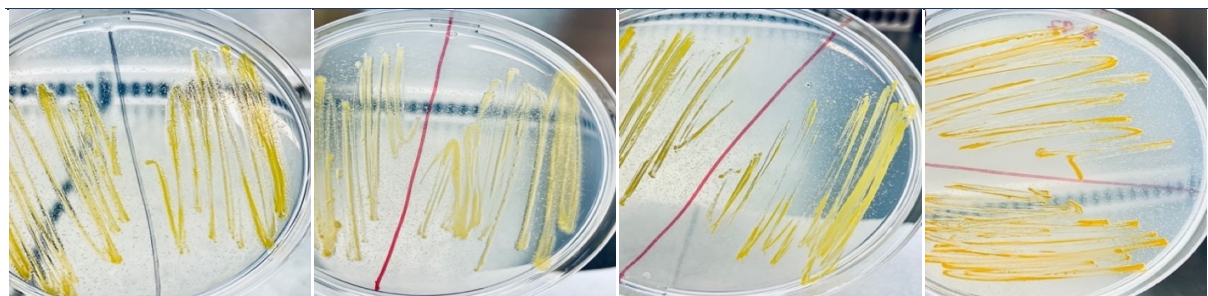
4.3. METAGENOMISK IDENTIFISERING

Isolert, amplifisert og renset 16S rDNA fra 46 isolater ble sendt til Eurofins, Tyskland, for sekvensering ved Sangers-metode. Programmet Clone Manager ble brukt for å lime sammen sekvensene mottatt fra Eurofins. For å finne beste artstreff for sekvensene ble sekvensen sammenlignet med eksisterende sekvenser i artsdatabasen BLAST [74]. Ved sammenligning i BLAST ble den prosentvise identiteten mellom sekvensene fra Clone Manager og sekvensen til artene fra artsdatabasen studert.

Tabell 4 viser oversikten over isolatene, hvor de er høstet fra, beste artstreff i BLAST [74], lengde av sekvensene, prosentvis likhet til den aktuelle arten, BSL og familien som arten er medlem av. **Figur 15** og **16** viser et utvalg av agarplater som ble dyrket i **Del 3.2.1**. Restende bilder er vedlagt i **Vedlegg 5**. Bildene ble benyttet til å kvalitetssikre resultater fra sekvensering av 16S rDNA.



Figur 15 Agarplater fra Del 3.2.1. Dyrking av bakterier isolert fra tare sommeren 2020. Fra venstre: isolat 11, 52, 66, 96.



Figur 16 Agarplater fra Del 3.2.1. Dyrking av bakterier isolert fra tare sommeren 2020. Fra venstre: isolat 59, 68, 77a, 97.

Tabell 4 Resultater fra 16S rDNA Sanger-sekvensering. SL; Sukkertare, AE; Butare

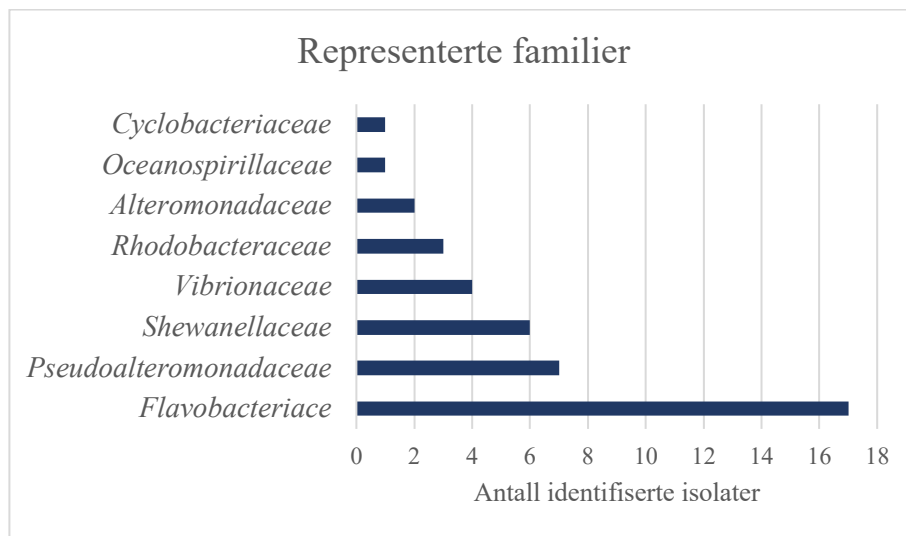
Isolat nr.	Forsøk	Tare	Del av plante	Beste treff BLAST	Lengde (BP)	Identitet (%)	BSL	Familie
1	Aure	Martaum	Hele	<i>Cellulophaga sp. An110</i>	1383	99,7	1 [75]	Flavobacteriaceae
3	Aure	Martaum	Hele	<i>Algibacter sp.Ld13</i>	1402	99,5		Flavobacteriaceae
5	Aure	Martaum	Hele	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1424	99,6	2 [76]	Vibrionaceae
6	Aure	Martaum	Hele					
7	Aure	Blæretang	Hele					
9	Aure	Blæretang	Hele	<i>Algibacter lectus</i>	1411	99,9	1 [77]	Flavobacteriaceae
11	Aure	Grisetang	Hele	<i>Pseudoalteromonas aliena</i>	1401	99,9	1 [78]	Pseudoalteromonadaceae
13	Aure	Grisetang	Hele					
14	Aure	Grisetang	Hele	<i>Marinomonas gallaica</i>	1425	98,7	1 [79]	Oceanospirillaceae
16	Aure	Sagtang	Hele					
19	Aure	Sagtang	Hele	<i>Cellulophaga fucicola</i>	1410	99,9	1 [80]	Flavobacteriaceae
22	Aure	Rødalge på sagtang	Hele	<i>Algibacter lectus</i>	1411	99,4	1 [81]	Flavobacteriaceae
23	Aure	Rødalge på sagtang	Hele	<i>Cellulophaga sp. An110</i>	1383	99,4	1 [75]	Flavobacteriaceae
24	Aure	Rødalge på sagtang	Hele	<i>Vibrio alginolyticus</i>	1451	99,8	2 [82]	Vibrionaceae
27	Grip	SL 5	Midt	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	1422	98,9	1 [83]	Pseudoalteromonadaceae
31	Grip	SL 6	Rot	<i>Cellulophaga sp. An66</i>	1411	100,0		Flavobacteriaceae
32	Grip	SL 6	Midt	<i>Paraglaciecola mesophila</i>	1413	99,8	1 [84]	Alteromonadaceae
39	SES3	AE	Rot	<i>Algibacter miyuki</i>		99,6	1 [85]	Flavobacteriaceae
41	SES3	AE	Rot	<i>Olleya mesophilus</i>	1407	99,8	1 [86]	Flavobacteriaceae
42	SES3	AE	Rot	<i>Shewanella livingstonensis</i>	1413	99,7		Shewanellaceae
43	SES3	AE	Midt	<i>Shewanella baltica</i>	1454	99,7	1 [87]	Shewanellaceae
45a	SES3	AE	Opp	<i>Shewanella japonica</i>	1435	100,0	1 [88]	Shewanellaceae
49	SES3	AE	Rot	<i>Vibrio sp. V632</i>	1448	99,7	2	Vibrionaceae
51	SES3	AE	Midt	<i>Shewanella sp. STAB101</i>	1418	99,8		Shewanellaceae
52	SES3	AE	Midt	<i>Pseudoalteromonas distincta</i>	1402	99,7	1 [89]	Pseudoalteromonadaceae
58	SES3	SL	Midt	<i>Sulfitobacter sp. KS8-4</i>	1359	99,5	1 [90]	Rhodobacteraceae
59	SES3	SL	Midt	<i>Cellulophaga fucicola</i>	1409	100,0	1 [80]	Flavobacteriaceae
66	SES3	SL	Midt	<i>Sulfitobacter sp. KS8-4</i>	1339	98,4	1 [90]	Rhodobacteraceae
68	SES3	SL	Opp	<i>Cellulophaga baltica</i>	1383	99,8	1 [75]	Flavobacteriaceae
71	SES1+ SES2	AE	Rot					
72	SES1+ SES2	AE	Rot	<i>Lacinutrix ilipiscaria</i>	1405	99,8	1 [91]	Flavobacteriaceae
75	SES1+ SES2	1 SL	Rot	<i>Shewanella sp. KASP32</i>	1411	100,0		Shewanellaceae
77a	SES1+ SES2	1 SL	Rot	<i>Olleya namhaensis</i>	1387	98,9	1 [92]	Flavobacteriaceae
78	SES1+ SES2	1 SL	Rot	<i>Vibrio sp.</i>	1442	99,9	2	Vibrionaceae
79a	SES1+ SES2	1 SL	Ned	<i>Loktanella sp. Lw-27b</i>	1354	100,0		Rhodobacteraceae
79	SES1+ SES2	1 SL	Ned	<i>Flavobacterium frigidarium</i>	1404	99,6	1 [93]	Flavobacteriaceae
85	SES1+ SES2	2 SL	Rot	<i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	1432	99,9	1 [94]	Pseudoalteromonadaceae
86	SES1+ SES2	2 SL	Rot	<i>Paraglaciecola chathamensis</i>	1298	99,6	1 [95]	Alteromonadaceae
88	SES1+ SES2	2 SL	Rot	<i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	1401	99,9	1 [94]	Pseudoalteromonadaceae
89	SES1+ SES2	2 SL	Ned	<i>Shewanella ulleungensis</i>	1373	99,0		Shewanellaceae
90	SES1+ SES2	2 SL	Ned	<i>Polaribacter undariae</i>	1355	100,0	1 [96]	Flavobacteriaceae
93	SES1+ SES2	2 SL	Midt	<i>Pseudoalteromonas sp. gauthier</i>	1426	99,9	1 [97]	Pseudoalteromonadaceae
94	SES1+ SES2	2 SL	Midt	<i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	1400	99,6	1 [98]	Cyclobacteriaceae
95	SES1+ SES2	2 SL	Midt	<i>Cellulophaga sp. An66</i>	1386	100,0		Flavobacteriaceae
96	SES1+ SES2	2 SL	Midt	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	1338	99,9	1 [99]	Pseudoalteromonadaceae
97	SES1+ SES2	2 SL	Opp	<i>Nonlabens xylanidelens</i>	1415	99,2	1 [100]	Flavobacteriaceae

Av 46 ukjente bakterieisolater ble 16S rDNA fra 42 isolater amplifisert og sekvensert slik at det var mulig å tildele isolatene en slekt eller en eksakt stamme. 4 av artene funnet i BLAST var klassifisert som klasse 2 organismer i henhold til BSL-klassifisering, og for 9 av artene ble ikke BSL-klassifisering funnet. Disse artene ble ekskludert fra videre arbeid, da arbeid med klasse 2 organismer ville ha medført andre arbeidsmetoder og sikkerhetstiltak. Resterende arter var klassifisert som klasse 1 organismer. Den laveste prosentvise sekvenslikheten mellom sekvenssøket og det aktuelle artstreffet var 98,4% for isolat nummer 66 (*Sulfitobacter sp.* KS8-4), og høyest prosentvise identitet var 100% for isolat nummer 31 (*Cellulophaga sp.* An66 (*Cellulophaga pacifica*)), 45a (*Shewanella japonica*), 59 (*Cellulophaga fucicola*), 75 (*Shewanella sp.* KASP32), 79a (*Lokantella sp.* Lw-27b), 90 (*Polaribacter undariae*) og 95 (*Cellulophaga sp.* An66).

Vedlegg 5 viser koloniene for alle isolatene identifisert ved 16S-rDNA. Bildene viser til at alle isolatene identifisert som *Flavobacteriaceae* hadde gule eller oransje kolonier. Isolater i familiene *Pseudoalteromonadaceae*, *Alteromonadaceae* og *Vibrionaceae* hadde enten hvite eller blanke kolonier. *Oceanosprilliaceae*- og *Rhodobacteraceae*-isolater hadde alle hvite kolonier. Kolonier av isolater fra *Shewanellaceae* fremsto som lys rosa i fargen. Pigmentene observert under studiet ble funnet til å være samsvarende med tidligere observasjoner gjort på disse familiene [42, 43, 44, 45, 46, 47, 48].

De fleste artene som ble identifisert var isolert fra Sukkertare og Butare. Fra **Tabell 4** kan slektene *Pseudoalteromonas*, *Shewanella*, *Vibrio* og *Olleya* observeres ved begge artene. Slekten *Shewanella* og *Olleya* ble ikke identifisert på noen av de andre tareartene. I motsetning til *Vibrio* som i tillegg ble isolert fra Martaum og rødalge fra Sagtang, og *Pseudoalteromonas* ble i tillegg isolert fra Grisetang. Slekten *Cellulophaga* ble isolert fra både Martaum, Sagtang, rødalge fra Sagtang og Sukkertare. Slekten *Algibacter* ble isolert fra artene Martaum, Blæretang, rødalge fra Sagtang og Butare. Ut over disse slektene var det variasjon i hvilke slekter som ble isolert fra de ulike tareartene. *Marinomonas* ble kun isolert fra Grisetang, og slekten *Lacinutrix* ble kun identifisert på Butare. Slekten *Paraglaciecola*, *Sulfitobacter*, *Lokantella*, *Flavobacterium*, *Polaribacter*, *Nonlabens* og *Algoriphagus* ble kun isolert fra Sukkertare.

Figur 17 gir en oversikt over de identifiserte familiene og antall isolater som ble funnet til å tilhøre familiene. Av de 41 identifiserte artene var det 32 unike arter fordelt på 15 slekter. Slektene som hadde høyest representantantall var slektene *Cellulophaga* (17,1%), *Pseudoalteromonas* (17,1%) og *Shewanella* (14,6%). Disse slektene var fordelt på 8 familier, hvor de største var *Flavobacteriaceae* (41,5%), *Pseudoalteromonadaceae* (17,1%) og *Shewanellaceae* (14,6%).



Figur 17 Diagram som viser antallet isolater identifisert innenfor hver av de åtte familiene.

En tidligere studie av mikrobiomet på overflaten av Grisetang i Frankrike i 2014 [49] viser til en korrelasjon med familiene identifisert i dette studiet. Slektene *Cellulophaga* og *Pseudoalteromonas*, samt familien *Flavobacteriaceae* var også i studiet av Grisetang slektene og familien med høyest representantantall [49]. Fra Frankrike ble derimot et høyere antall identifisert som medlemmer av slekten *Marinomonas* og familiene *Oceanospirillaceae* og *Rhodobacter* [49]. Det kan derfor tenkes at det prosentvise antallet ville sett annerledes ut dersom det hadde blitt identifisert et høyere antall isolater. En studie gjort på mikrobiomet til grønnalgen *Ulva australis* ([101] viser derimot en markant forskjell fra familiene som ble identifisert i dette studiet. Her var familien *Rhodobacteriaceae* den mest representerte med 37% av de identifiserte bakteriene, mens *Flavobacteriaceae* kun inneholdte 15% [101]. I tillegg var familiene *Shingomonadaceae* (12,5%) og *Sapropraceae* (11,2%) representert i studien av *Ulva australis* [101]. *Shingomonadaceae* og *Sapropraceae* ble ikke identifisert i denne studien. Tidligere studier som har blitt gjort på variasjonene i mikrobiomet på ulike tareplanter høstet fra ulike steder har også vist at alderen og hvilket stadium planten er i livssyklusen er med på å skape variasjoner

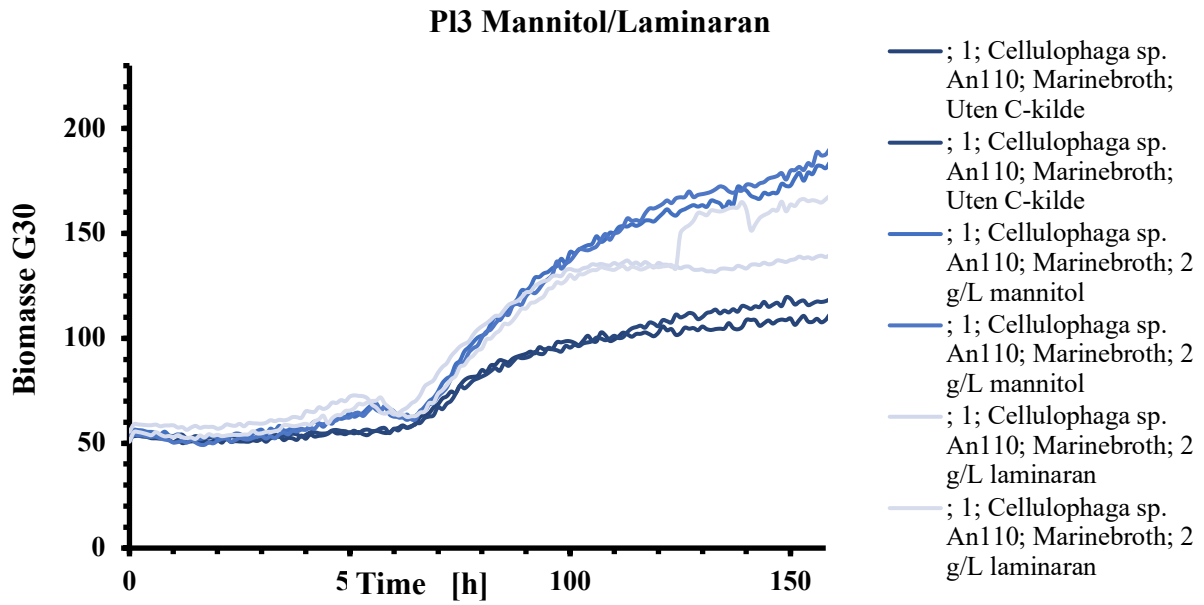
i det bakterielle samfunnet [101]. En studie gjort på variasjonene i mikrobiomet på planten *Laminaria hyperborea* (Stortare) viste til en markant forskjell på samfunnet i mars når planten har høyest vekstrate kontra samfunnet resten av året [102]. Fra tidligere forsøk har det også blitt informert om ulikheter i det mikrobielle samfunnet basert på lokasjonen plantene er høstet fra.

Sammenlignet med studier gjort på det mikrobielle samfunnet på Grisetang [49] og *U. Australis* [101], var utgangstallet isolater veldig lavt i denne studien. I tillegg ble bakterier ekskludert basert på fenotypiske likheter med andre bakterier ved to anledninger før gjennomføringen av 16S rDNA-sekvensering. På grunn av det begrenset antall isolater som ble sekvensert, og at fordelingen av isolater fra de ulike plantene høstet var skjevt fordelt, er det ikke et godt nok grunnlag for å avklare om det er en betydelig forskjell på det mikrobielle samfunnet på de ulike tareartene benyttet i dette studiet. Det observeres derimot at familiene *Flavobacteriaceae* og *Pseudoalteromonadaceae* gjentakende på artene høstet i dette studiet og studier gjort på andre arter.

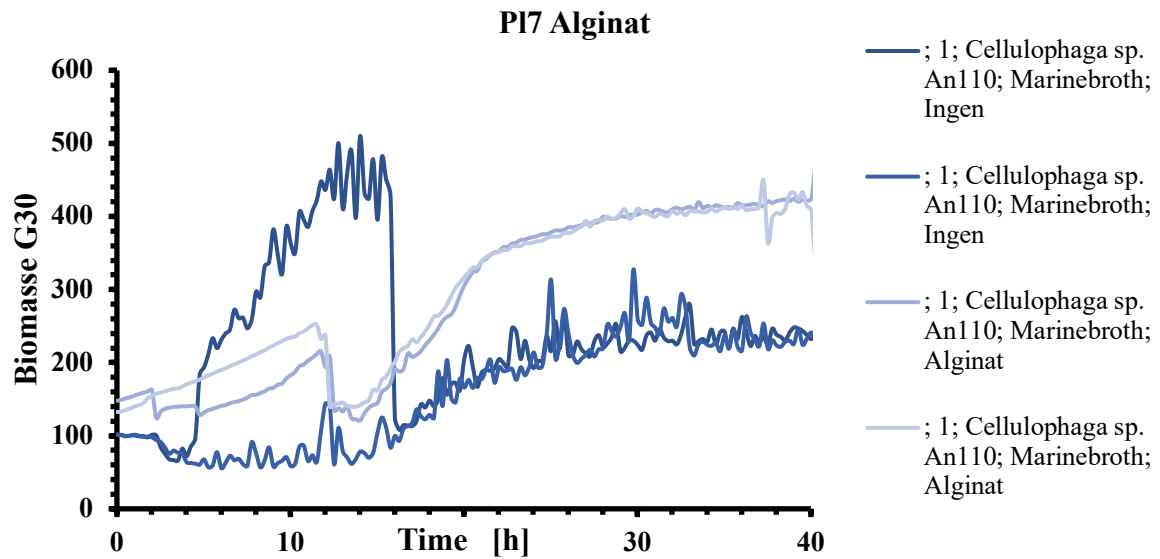
4.4. MÅLINGER AV BIOMASSE VED TILSATS AV ULIKE KARBONKILDER

Basert på resultatet fra Sanger-sekvensering ble det plukket ut 29 bakterieisolater som ble dyrket i mikrofermentorer med Marine Broth med tilsatts av ulike marine karbonkilder som dyrkingsmedium. Karbonkildene som ble benyttet var henholdsvis mannitol, laminaran, alginat og fucoidan. Som en referanse ble isolatene i tillegg dyrket i Marine Broth uten tilsatt karbonkilde. Isolatene ble dyrket i brønnplater med to paralleller for hvert isolat i hvert medium. Under dyrkingen ble biomassen til isolatene målt kontinuerlig, og ved avslutning av forsøk ble det målt OD av alle brønnene.

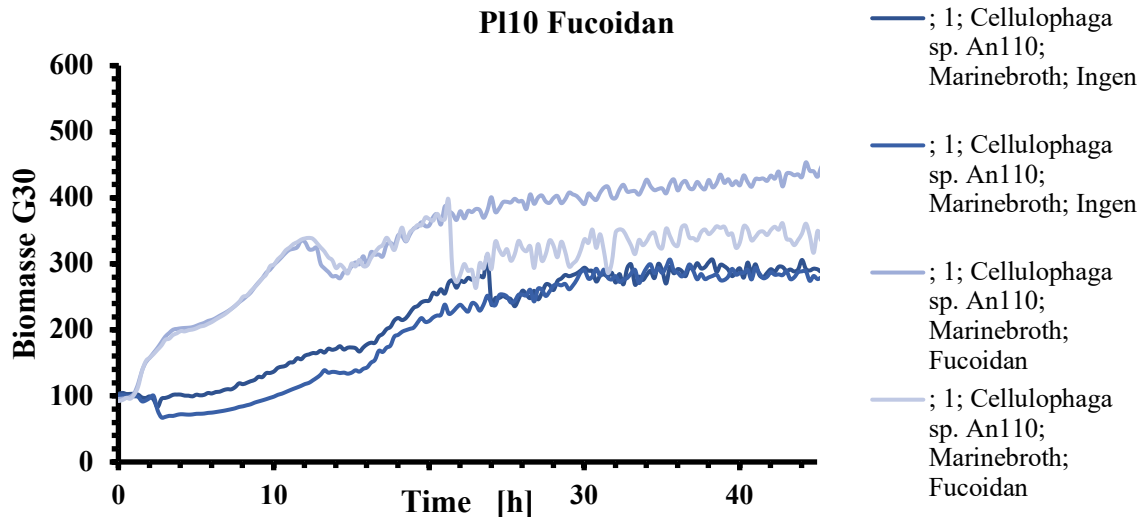
Biomasseverdiene som ble tatt underveis i forsøkene ble plottet som vekstkurver. Vekstkurvene for alle isolatene er vist i **Vedlegg 6. Figur 18, Figur 19 og Figur 20** viser vekstkurvene for isolat nummer 1, *Cellulophaga sp. An110 (Cellulophaga baltica)*, med og uten tilsatt karbonkilder. Vekstkurvene er vist som biomasse ved gain 3 som funksjon av tid. Vekstkurvene viser at tilsatt av mannitol, laminaran, alginat og fucoidan har en positiv effekt på biomasseproduksjonen av *C. baltica*.



Figur 18 Vekstkurve av biomassen som funksjon av tiden for isolat nummer 1, *Cellulophaga baltica*, i Marine Broth med og uten tilsats av mannitol (2 g/L) og laminaran (2 g/L).



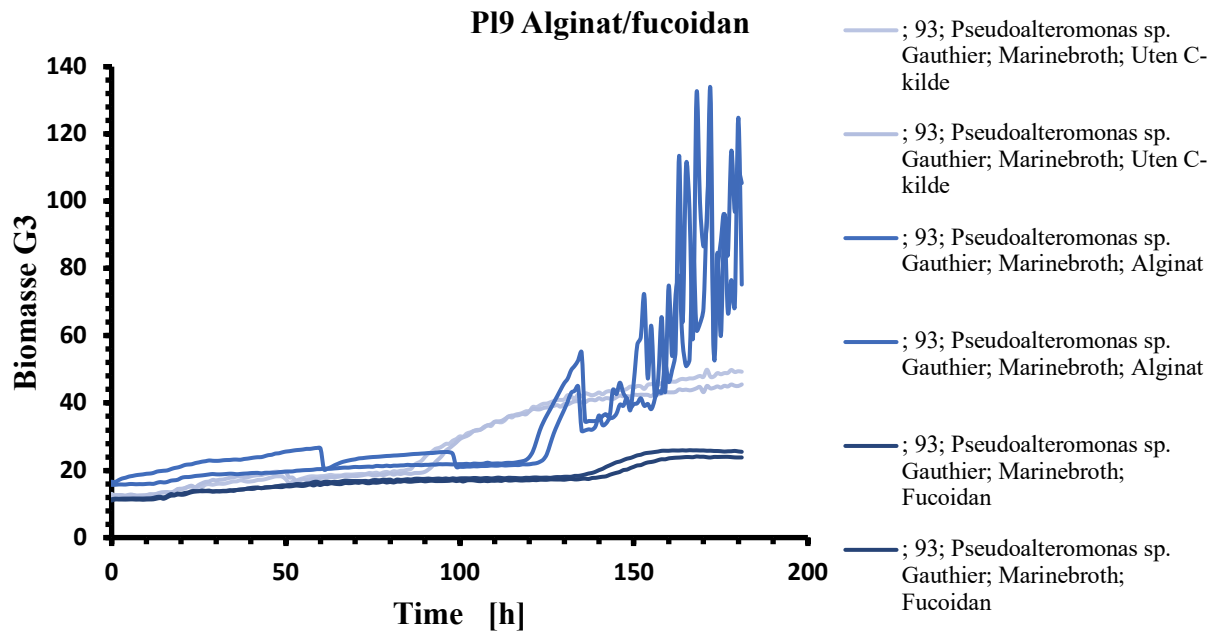
Figur 19 Vekstkurve av biomassen som funksjon av tiden for isolat nummer 1, *Cellulophaga baltica*, i Marine Broth med og uten tilsats av alginat (2 g/L).



Figur 20 Vekstkurve av biomassen som funksjon av tiden for isolat nummer 1, *Cellulophaga baltica*, i Marine Broth med og uten tilsats av fucoidan (2 g/L).

Vekstkurvene i **Vedlegg 6** viser overordnet til gode paralleller for de fleste isolatene i de forskjellige mediene. Vekstkurvene fra brønnplatene som var en av de senere til å bli kultivert kom derimot en del høyere opp i biomasse enn de første platene. Da dette var en gjennomgående trend for alle isolatene, ble det anslått til å være to grunner til denne økningen. Økningen kan ha skyldtes bytte av type brønnplate. I de første kultiveringsrunden ble plater med helt runde brønner benyttet, men etter hvert ble platene byttet til plater med flower-brønner. Formen på disse brønnene kan ha fungert som baffels, slik at det ikke oppstår vorteks, som igjen har ført til økt oksygentilførsel for organismene. En annen grunn til økningen i biomasse kan begrunnes i at de første platene ble inokulert med forkulturer som stammet fra fryst glyserolampuller, mens det senere platene ble inokulert med forkulturer som kontinuerlig ble re-inokulert. Dette kan ha ført til en kortere lagfase, og derav en økt maksimal biomasse i løpet av inkubasjonstiden.

Vekstkurvene for isolatene dyrket i Marine Broth tilsatt alginat viste ved flere anledninger ujevne vekstkurver (**Figur 21**). Ujevnheterne kan tyde på partikkeldannelser i mediet som kan ha forårsaket unøyaktige målinger av biomasse. I tillegg opplevdes mediet med tilsetning av alginat som mer viskøse enn de andre mediene. Viskositeten til mediet kan ha ført til for lite sirkulasjon i mediet ved 700 RPM, som igjen kan ha ført til heterogene kulturer.



Figur 21 Vekstkurve for isolat nummer 93, *Pseudoalteromonas Gauthier*, dyrket i Marine Broth med og uten tilsats av alginat (2 g/L) og fucoidan (2 g/L).

I tillegg til isolater ble det i alle platene kjørt minst fire negative kontroller, to paralleller for hvert dyrkingsmedium i platen. Kontrollene ble brukt for å ha en basislinje ved sammenligning av resultatene. Begge kontrollene med fucoidan i plate 11 hadde en økning i biomasse under dyrkning, som antyder forurensning av uønskede mikroorganismer. Samtidig ble det ikke observert antydninger til forurensning i det negative kontrollene uten tilsats av fucoidan. Denne observasjonen antyder at forurensningen kan stamme fra mediet, og derfor være overført til brønnene med isolater. Denne alikvoten av Marine Broth tilsatt fucoidan ble ikke brukt i flere av brønnplatene.

Vekstkurvene ble brukt for å undersøke polysakkaridaktiviteten til isolatene. **Tabell 5** inneholder en samlet oversikt over effekten av de ulike karbonkildene på 29 av isolatene identifisert fra sekvenseringen. Tabellen har tatt utgangspunkt i den eventuelle effekten av karbonkildetilsetser på biomasseproduksjonen. Fra de 29 isolatene ble 10 vurdert til å ha aktivitet på minst en av karbonkildene som ble tilsatt. Dette tilsvarer en prosentvis andel på 35% som peker mot at den dyrkbare mikrobiotaben er beriket med Polysakkarid-degraderende bakterier.

Tabell 5 Observeringer gjort på polysakkaridaktivitet for 29 av de identifiserte bakterien. Økt biomasse i forhold til dyrkning i mediet uten tilsatts av karbonkilde registreres som positiv effekt (+), ingen økning i biomasse registreres som ingen effekt (0) og lavere verdier for biomasse registreres som negativ effekt (-). Tendenser til økt biomasse, som for eksempel en voksende vekstkurve ved avslutning av forsøk, registreres som en mulig positiv effekt (*).

Familie	Isolat nr.	Nærmeste bakteriestamme	Polysakkaridaktivitet			
			M	L	A	F
<i>Flavobacteriaceae</i>	1	<i>Cellulophaga sp. An110</i>	+	+	+	+
	9	<i>Algibacter lectus</i>	+	+	0	-
	19	<i>Cellulophaga fucicola</i>	-	0	-	*
	22	<i>Algibacter lectus</i>	-	0	-	-
	23	<i>Cellulophaga sp. An110</i>	0	*	-	-
	39	<i>Algibacter miyuki</i>	*	0	-	*
	41	<i>Olleya mesophilus</i>	*	0	-	-
	59	<i>Cellulophaga fucicola</i>	0	0	-	*
	68	<i>Cellulophaga baltica</i>	0	+	-	-
	72	<i>Lacinutrix ilipiscaria</i>	0	*	-	-
	77a	<i>Olleya namhaensis</i>	+	*	0	0
	79	<i>Flavobacterium frigidarium</i>	-	-	-	-
	90	<i>Polaribacter undariae</i>	*	-	-	-
	97	<i>Nonlabens xylanidelens</i>	0	+	0	+
<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	11	<i>Pseudoalteromonas aliena</i>	-	0	-	-
	27	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	0	0	0	-
	52	<i>Pseudoalteromonas distincta</i>	*	0	-	-
	85	<i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	-	-	-	-
	88	<i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	-	-	-	-
	93	<i>Pseudoalteromonas sp. Gauthier</i>	+	-	+	-
	96	<i>Pseudoalteromonas haloplanktis</i>	0	+	-	+
<i>Oceanospirillaceae</i>	14	<i>Marinomonas gallaica</i>	0	-	-	-
<i>Alteromonadaceae</i>	32	<i>Paraglaciecola mesophilia</i>	*	0	-	-
	86	<i>Paraglaciecola chathamensis</i>	*	-	-	-
<i>Shewanellaceae</i>	43	<i>Shewanella baltica</i>	*	0	-	+
	45a	<i>Shewanella japonica</i>	0	0	-	+
<i>Rhodobacteraceae</i>	58	<i>Sulfitobacter sp. KS8-4</i>	0	0	*	0
	66	<i>Sulfitobacter sp. KS8-4</i>	0	0	-	-
<i>Cyclobacteriaceae</i>	94	<i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	*	*	+	-

M, mannitol; L, laminaran; A, alginat; F, fucoidan; + positiv effekt; -, negativ effekt; 0, ingen effekt; *, tendenser til positiv effekt

Isolatene med degraderende egenskaper ble fordelt på 7 slekter og 4 familier. Både familien *Flavobacteriaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Shewanellaceae* og *Cyclobacteriaceae* ble funnet til å inneholde polysakkarid-degraderende bakterier. Slektene i familien *Oceanospirillaceae*, *Alteromonadaceae* og *Rhodobacteraceae* inneholdte derimot ikke bakterier med degraderende egenskaper. I familien *Flavobacteriaceae* ble 5 av 14 (35,7%) isolater identifisert til å

ha degraderende egenskaper, hvor bakteriene tilhørte slektene *Cellulophaga*, *Olleya*, *Algibacter* og *Nonlabens*. Fra *Pseudoalteromonadaceae* hadde 2 av 7 (28,57%) isolater disse egenskapene, hvor alle tilhørte slekten *Pseudoalteromonas*. Som en motsetning hadde isolatet som taksonomisk ble identifisert som *Flavobacterium frigidarium* og begge isolatene identifisert som *Pseudoalteromonas espejiana* en negativ effekt av alle karbonkildene.

Studiet tidligere nevnt som ble gjennomført på Grisetang fant i likhet med dette studiet et høyt antall bakterier med polysakkaridaktivitet (24%) [52]. I studiet ble det funnet at slektene *Cellulophaga* og *Pseudoalteromonas* hadde en stor prosentandel av det polysakkarid-degraderende bakteriene. Nesten alle artene identifisert som *Pseudoalteromonas* og *Cellulophaga* under studiet av Grisetang viste polysakkaridaktivitet på alginat [52]. Dette er til dels motstridende i hva som ble funnet i dette studiet, da kun *Cellulophaga baltica* fra slekten *Cellulophaga* hadde en økt biomasse ved tilsatts av alginat. I studien av Grisetang ble det i likhet med dette studiet observert at *Paraglaciecola mesophila* ikke hadde polysakkaridaktivitet på alginat, mens artene *Shewanella japonica* og *Shewanella baltica* hadde degraderende egenskaper. Som en motsetning ble slekten *Marinomonas* funnet til å ha degraderende egenskaper på alginat [52]. Dette ble ikke observert under dette studiet. Ut over studiet gjort på Grisetang eksisterer det få studier som omhandler de degraderende egenskapene til det mikrobielle samfunnet på tare.

Tabell 7.1. og 7.2 i Vedlegg 7 viser til OD-målinger, maksimale verdier for biomasse og observasjoner gjort av brønnene etter kultivering. Fra observasjonene gjort på aggregering, kan det trekkes frem at en stor andel av isolatene tilhørende *Pseudoalteromonadaceae* dannet aggregater i løpet av kultivering. Dette er dannelser som underveis i kultivering trolig har påvirket målingene gjort på biomasse, i tillegg til at de kan ha gitt unøyaktige OD-målinger. De andre identifiserte familiene hadde også slekter som viste tendenser til aggregering i minst ett av mediene, hvor *Flavobacteriaceae* var familien med færrest aggregatdannende bakterier i forhold til antall identifiserte isolater. Isolat nummer 39 (*Algibacter miyuki*) og 72 (*Lacinutrix sp. JR-M6*) var de eneste isolatene som ikke viste tendenser til aggregering i noen av mediene.

OD-målingene viser til en del variasjon i maksimalt oppnådd OD. OD-verdiene fra brønnene med Marine Broth uten tilsatser var ofte lavere i de første platene som ble inkubert. Dette kan komme av byttet av type plater som nevnt tidligere. Flower-platene kan ha økt oksygentilførselen i forhold til Round-platene, noe som kan ha medført bedre vekstvilkår for bakteriene. Det ble observert en gjennomgående sammenheng mellom økt biomasse og OD-målinger, selv om

noen trolig ble påvirket av aggregatdannelse. Dette er observasjoner som underbygger resultatene gitt i **Tabell 5**.

4.5. VIDERE ARBEID

Videre arbeid med utgangspunkt i resultatene fra denne oppgaven kan bestå av enzymatisk alginat analyse på et utvalg av bakterieisolatene. Enzymatisk alginat analyse vil da kunne fungere som en kontroll på resultatene fra denne studien. Det vil derfor være fordelaktig å inkludere både isolater som hadde en positiv og negativ effekt av alginat basert på biomasse. Isolat med positiv effekt kan eksempelvis være *Cellulophaga baltica* (Isolat 1), og isolat med negativ effekt kan være *Flavobacterium frigidarium* (isolat 79). Det kan også være aktuelt å gjennomføre slike analyser basert på de andre substratene.

I tillegg kunne det vært interessant å se på effekten av karbonkildene i et minimalmedie. Under dette forsøket ble det benyttet et rikt medie med alle næringsstoffer inkludert fra før. Ved dyrking i et minimalmedie kan det tenkes at forskjellene i biomasse ville ha blitt enda mer markante enn i det rike mediet. I etterkant av et slikt screening-oppsett ville det ha vært aktuelt å utføre helgenom sekvensering for å identifisere enzymene som degraderer karbonkildene i bakteriene som har vist en positiv effekt av tilsatsene. Ut fra dette kan det tenkes at det vil bli oppdaget nye MAPD-enzymmer som kan studeres videre.

For å få bredere kunnskap om variasjonene i de mikrobielle samfunnet på ulike tarearter ville det ha vært aktuelt å identifisere et større antall av de isolerte bakteriene. Etter en slik identifisering ville det igjen vært aktuelt å kjøre karbonkilde-screening for å avdekke polysakkaridaktiviteten til de identifiserte isolatene.

5. KONKLUSJON

Ved sekvensering av 16S rDNA-sekvensen fra 46 ukjente bakterieisolater ble 41 av isolatene høstet fra ulike tarearter identifisert med stammenavn, slektsnavn og familienavn. Deen laveste prosentvise identiteten funnet ved søk i artsdatabasen BLAST var 98,4% for isolat nummer 66 *Sulfitobacter sp.* Ks8-4 og høyest identitet var 100% for isolatene identifisert som *Cellulophaga pacifica* (31 og 95), *Shewanella japonica* (45a), *Cellulophaga fucicola* (56), *Shewanella sp.* KASP32 (75), *Lokantella sp.* Lw27b (79a) og *Polaribacter undariae* (90). Av de 41 identifiserte artene var det 32 unike arter fordelt på 15 slekter. Slekten *Cellulophaga*, *Pseudoalteromonas* og *Shewanella* var blant slektene med høyest representantantall på henholdsvis 17,07%, 17,07% og 14,62 %. De 15 slektene ble igjen fordelt på 8 familier, hvor *Flavobacteriaceae* (41,46%) og *Pseudoalteromonadaceae* (17,07%) var de største familiene. Ved sammenligning av opphavet til de identifiserte isolatene ble det funnet et slekten *Cellulophaga* og *Algibacter* funnet til å være isolert fra flertallet av tareartene. Ut over disse slektene varierte innholdet i mikrobiotaen med ulike tarearter.

Fra de 41 identifiserte isolatene deltok 29 av disse i kultiveringsforsøk med anrikning av karbonkilder. 10 av de 29 isolatene viste en økt biomasseproduksjon ved tilsatts av minst ett av substratene mannitol, alginat, agar og fucoidan. Dette tilsvarte en prosentandel på 35% av de totale antallet isolater undersøkt for polysakkaridaktivitet. Av de ti isolatene tilhørte fem av isolatene familien *Flavobacteriaceae*, hvor slektene *Cellulophaga*, *Olleya*, *Algibacter* og *Nonlabens* var representert. I familien *Pseudoalteromonadaceae* hadde 2 av 7 isolater degraderende egenskaper på minst ett av substratene, hvor alle isolatene tilhørte slekten *Pseudoalteromonas*. Observasjonene gjort under studien peker derfor mot at overflaten av tare er et gunstig habitat for polysakkarid-degraderende bakterier og at den dyrkbare mikrobiotaen til tare er anriket med slike organismer. Ut fra disse bakteriene kan det trolig detekteres og isoleres nye enzymer innenfor underklasser av kjente CAZy-familier som kan benyttes til kommersielle formål.

REFERANSER

1. Tang og Tare [Internett]. Lofoten Blue Harvest. 2022 [siteret 2022]. Hentet fra: <https://lofoten-blueharvest.com/nb/tang-og-tare>
2. Walker L, Brown C. The marine microbiome. London: Society for Applied Microbiology; 2018 p. 1-5.
3. Singh R, Reddy C. Seaweed-microbial interactions: key functions of seaweed-associated bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 2014;88(2):213-230.
4. Norwegian Seaweed Technology Center - SINTEF [Internett]. SINTEF. 2022 [siteret 11. februar 2022]. Hentet fra: <https://www.sintef.no/en/ocean/initiatives/norwegian-seaweed-technology-center/>
5. Pereira L. Macroalgae. 1st ed. MDPI. Coimbra: University of Coimbra; 2021.
6. Kim S. Handbook of Marine Macroalgae. 1st ed. Oxford: John Wiley & Sons, Ltd; 2012.
7. fukoxantin – Store norske leksikon [Internett]. Store norske leksikon. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://snl.no/fukoxantin>
8. Kim S. Handbook of marine macroalgae. Chichester: Wiley-Blackwell; 2012.
9. Rueness J. grønnalger – Store norske leksikon [Internett]. Store norske leksikon. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://snl.no/gr%C3%B8nnaalger>
10. Winged Kelp — Wakame — Alaria Esculenta — Seaweed Solutions [Internett]. Seaweed Solutions. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://seaweedsolutions.com/winged-kelp-wakame-alaria-esculenta>
11. Wild Wakame Seaweed - Wild Walks Southwest [Internett]. Wild Walks Southwest. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.wildwalks-southwest.co.uk/wild-wakame-seaweed/>
12. Bolton J, Germann I, Luning K. Hybridization between Atlantic and Pacific representatives of the Simplicies section of *Laminaria* (Phaeophyta). *Phycologia*. 1983;22(2):133-140.
13. NTNU. Cultivation of *Saccharina latissima* (Phaeophyceae) in temperate marine waters: nitrogen uptake kinetics, growth characteristics and chemical composition. NTNU; 2020 p. 1-50.
14. Sugar Kelp — Kombu — *Saccharina Latissima* — Seaweed Solutions [Internett]. Seaweed Solutions. 2022. Hentet fra: <https://seaweedsolutions.com/sugar-kelp-kombu-saccharina-latissima>
15. Good to know about food-grade kelp - Nofima [Internett]. Nofima. 2022 [siteret 2022]. Hentet fra: <https://nofima.com/worth-knowing/good-to-know-about-food-grade-kelp/>

16. MarLIN - The Marine Life Information Network - Sea lace or Dead man's rope (*Chorda filum*) [Internett]. Marlin.ac.uk. 2022 [sitert 18 May 2022]. Hentet fra: <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1366>
17. Rueness J. grisetang – Store norske leksikon [Internett]. Store norske leksikon. 2022 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://snl.no/grisetang>
18. MarLIN - The Marine Life Information Network - Knotted wrack (*Ascophyllum nodosum*) [Internett]. Marlin.ac.uk. 2022 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1336>
19. MarLIN - The Marine Life Information Network - Toothed wrack (*Fucus serratus*) [Internett]. Marlin.ac.uk. 2022 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.marlin.ac.uk/species/detail/1326>
20. Alginatprodukter [Internett]. Stortare.no. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.stortare.no/produkter.html>
21. García-Poza S, Leandro A, Cotas C, Cotas J, Marques J, Pereira L et al. The Evolution Road of Seaweed Aquaculture: Cultivation Technologies and the Industry 4.0. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020;17(18).
22. Food and agriculture Organization of the United Nations. The global status of seaweed production, trade and utilization. Rome: Food and agriculture Organization of the United Nations; 2018 p. 1-10.
23. Augyte S, Kim J, Yarish C. Seaweed aquaculture—From historic trends to current innovation. *Journal of the World Aquaculture Society* [Internett]. 2021 [sitert 2022];52(5):1004-1008. Hentet fra: <https://www.was.org/articles/Seaweed-aquaculture-From-historic-trends-to-current-innovation.aspx#.YoWAaS8eNpS>
24. Broch O. Tare dyrking i Norge (Hvor bør man dyrke og hvor stort er potensialet?) [Internett]. SINTEFblogg. 2019 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://blogg.sintef.no/sintefocean-nb/tare-dyrking-hvor-dyrke-hvor-stort-potensialet/>
25. polysaccharide | chemical compound [Internett]. Encyclopedia Britannica. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.britannica.com/science/polysaccharide>
26. Lobban C, Wynne M. *Biology of seaweeds*. 1st ed. Los Angeles: University of California press; 1981.
27. Venugopal V. *Marine polysaccharides*. Boca Raton: Taylor & Francis; 2011.
28. Venkatesan J, Anil S, Kim S. *Seaweed Polysaccharide Isolation, Biological and Biomedical Applications*. Elsevier; 2017.
29. De Ruiter G, Rudolph B. Carrageenan biotechnology. *Trends in Food Science & Technology*. 1997;8(12):389-395.
30. Caplin m. Alginate [Internett]. Water.lsbu.ac.uk. 2022 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://water.lsbu.ac.uk/water/alginate.html>

31. Handbook of pharmaceutical excipients. London: Pharmaceutical Press; 2006.
32. Valente J, Valente T, Alves P, Ferreira P, Silva A, Correia I. Alginate based scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2012;32(8):2596-2603.
33. Sanjeeva K, Jeon Y. Fucoidans as Scientifically and Commercially Important Algal Polysaccharides. *Marine Drugs*. 2021;19(6):284.
34. Zubia M, Payri C, Deslandes E. Alginate, mannitol, phenolic compounds and biological activities of two range-extending brown algae, *Sargassum mangarevense* and *Turbinaria ornata* (Phaeophyta: Fucales), from Tahiti (French Polynesia). *Journal of Applied Phycology*. 2008;20(6):1033-1043.
35. Varzakas T. Sweeteners. Boca Raton, Fla: CRC Press; 2012.
36. Wakai A, McCabe A, Roberts I, Schierhout G. Mannitol for acute traumatic brain injury. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2013;.
37. Bayón R, Rojas E. Feasibility study of D-mannitol as phase change material for thermal storage. *AIMS Energy*. 2017;5(3):404-424.
38. Nisizawa K, Yamaguchi T, Handa N, Maeda M, Yamazaki H. Chemical Nature of a Uronic Acid-Containing Polysaccharide in the Peritrophic Membrane of the Silkworm*. *The Journal of Biochemistry*. 1963;54(5):419-426.
39. Zargarzadeh M, Amaral A, Custódio C, Mano J. Biomedical applications of laminarin. *Carbohydrate Polymers* [Internett]. 2020 [sitert 2022];232. Hentet fra: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861719314420>
40. Sanjeeva K, Jeon Y. Edible brown seaweeds: a review. *Journal of Food Bioactives*. 2018;2.
41. Mikrobiomer, metagenomer og helse hos mennesker og dyr [Internett]. NMBU. 2020 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.nmbu.no/prosjekter/hunt/enHelse/mikrobiom>
42. Bernardet J, Nakagawa Y. An Introduction to the Family Flavobacteriaceae. *The Prokaryotes* [Internett]. 2006;:455-480. Hentet fra: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30747-8_16
43. Ivonova E, Ng H, Webb H. The Family Pseudoalteromonadaceae. Hawthorn: Swinburne University of Technology; 2022.
44. Farmer J. The Family Vibrionaceae. *The Prokaryotes* [Internett]. 2006 [sitert 2022];:495-507. Hentet fra: https://link.springer.com/referenceworkentry/10.1007/0-387-30746-X_17#citeas
45. Satomi M, Fujii T. The Family Oceanospirillaceae. [Internett]. Tokyo: National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Yokohama, Kanagawa, Japan; [sitert 2022]. Hentet fra: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-64238922-1_286.pdf

46. Pérez M, Rodríguez F. 5 The Family Alteromonadaceae [Internett]. Alicante: Universidad Miguel Hernández; [siteret 2022]. Hentet fra: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-38922-1_233.pdf
47. Satomi M. 31 The Family Shewanellaceae [Internett]. Yokohama: National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency; [siteret 2022]. Hentet fra: https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-642-38922-1_226.pdf
48. Pujalte M, Lucena T, Ruvira M, Arahall D, Macián M. The Family Rhodobacteraceae. *The Prokaryotes*. 2014;:439-512.
49. Martin M, Barbeyron T, Martin R, Portetelle D, Michel G, Vandenberg M. The Cultivable Surface Microbiota of the Brown Alga *Ascophyllum nodosum* is Enriched in Macroalgal-Polysaccharide-Degrading Bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6.
50. Hauge J, Vaaje-Kolstad G, Kierulf P. enzymer – Store norske leksikon [Internett]. Store norske leksikon. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://snl.no/enzymer>
51. Chakraborty S, Rani A, Dhillon A, Goyal A. Polysaccharide Lyases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*. 2017;:527-539.
52. Bengtsson M, Sjøtun K, Storesund J, Øvreås J. Utilization of kelp-derived carbon sources by kelp surface-associated bacteria. *Aquatic Microbial Ecology*. 2011;62(2):191-199.
53. What is the Difference Between 16s rRNA and 16s rDNA - Pediaa.Com [Internett]. Pediaa.Com. 2022 [siteret 2022]. Hentet fra: <https://pediiaa.com/what-is-the-difference-between-16s-rna-and-16s-rdna/>
54. Woo P, Lau S, Teng J, Tse H, Yuen K. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14(10):908-934.
55. MasterPure™ Gram Positive DNA Purification Kit [Internett]. Lucigen.com. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.lucigen.com/FAQ-MasterPure-Gram-Positive-DNA-Purification-Kit.html>
56. Prokaryot [Internett]. Mn.uio.no. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/p/prokaryot.html>
57. Stensland G. lysozym – Store medisinske leksikon [Internett]. Store medisinske leksikon. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://sml.snl.no/lysozym>
58. Fluorometer Spectrophotometer | Compact Spectrophotometer [Internett]. DeNovix. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.denovix.com/products/ds-11-fx-spectrophotometer-fluorometer/>
59. T042-TECHNICAL BULLETIN NanoDrop Spectrophotometers [Internett]. Thermo Scientific; 2022 [siteret 2022]. Hentet fra: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf
60. Renneberg R, Lorch V. *Biotechnology for beginners*. 2nd ed. Academic Press; 2016.

61. DNA Polymerase—Four Key Characteristics for PCR [Internett]. ThermoFisher.com. 2022 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.thermofisher.com/no/en/home/life-science/cloning/cloning-learning-center/invitrogen-school-of-molecular-biology/pcr-education/pcr-reagents-enzymes/dna-polymerase-characteristics.html>
62. Gel electrophoresis (article) | Khan Academy [Internett]. Khan Academy. 2022 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.khanacademy.org/science/apbiology/gene-expression-and-regulation/biotechnology/a/gel-electrophoresis>
63. GeneRuler 100 bp DNA ladder [Internett]. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0242>. 2022 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/SM0242>
64. Haugen M, Sonnenberg C. DNA-sekvensering – Store norske leksikon [Internett]. Store norske leksikon. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://snl.no/DNA-sekvensering>
65. University of Ottawa. Simulation of polymer translocation through small channels: A molecular dynamics study and a new Monte Carlo approach. 2007.
66. Pusterla T. High-throughput screening (HTS) [Internett]. BMGLabtech.com. Hentet fra: <https://www.bmglabtech.com/high-throughput-screening/>
67. Ratledge C, Kristiansen B. Basic Biotechnology. 5th ed. Cambridge: Cambridge University; 2006.
68. Services | m2p-labs [Internett]. M2p-labs.com. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.m2p-labs.com/services/>
69. Bioreactors | m2p-labs [Internett]. M2p-labs.com. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.m2p-labs.com/bioreactors/products/get-more-data/#!/6>
70. Expand High Fidelity PCR System [Internett]. 21st ed. Roche; 2016 [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/306/267/ehifi-robul.pdf>
71. GeneRuler 1 kb DNA Ladder [Internett]. ThermoFischer Scientific; [sitert 2022]. Hentet fra: https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FFLSG%2Fmanuals%2FMAN0013004_GeneRuler_1kb_DNALadder_250ug_UG.pdf
72. DNA Clean & Concentrator®-5 [Internett]. ZYMO reaserch; [sitert 2022]. Hentet fra: https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf
73. Sanger Sequencing at Eurofins Genomics [Internett]. Eurofinsgenomics.eu. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://eurofinsgenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/eurofins-services/tubeseq-service/>

74. BLAST: Basic Local Alignment Search Tool [Internet]. Blast.ncbi.nlm.nih.gov. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn>
75. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 24729 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-24729>
76. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 2171 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-2171>
77. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 15365 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-15365>
78. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 16473 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-16473>
79. Species: *Marinomonas gallaica* [Internet]. Lpsn.dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://lpsn.dsmz.de/species/marinomonas-gallaica>
80. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 24786 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-24786>
81. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 15365 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-15365>
82. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 2171 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-2171>
83. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 7507 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-7507>
84. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 15026 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-15026>
85. Species: *Algibacter miyuki* [Internet]. Lpsn.dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://lpsn.dsmz.de/species/algibacter-miyuki>
86. Species: *Psychroserpens mesophilus* [Internet]. Lpsn.dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://lpsn.dsmz.de/species/psychroserpens-mesophilus>
87. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 9439 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-9439>
88. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 15915 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-15915>
89. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 12749 [Internet]. Dsmz.de. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-12749>
90. Sulfitobacter sp. | ATCC [Internet]. Atcc.org. [sitert 2022]. Hentet fra: <https://www.atcc.org/products/baa-1142>

91. Species: *Lacinutrix iliipiscaria* [Internett]. Lpsn.dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://lpsn.dsmz.de/species/lacinutrix-iliipiscaria>
92. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 28881 [Internett]. Dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-28881>
93. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 17623 [Internett]. Dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-17623>
94. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 9414 [Internett]. Dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-9414>
95. Genus: *Paraglaciecola* [Internett]. Lpsn.dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://lpsn.dsmz.de/genus/paraglaciecola>
96. Species: *Polaribacter undariae* [Internett]. Lpsn.dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://lpsn.dsmz.de/species/polaribacter-undariae>
97. *Pseudoalteromonas* sp. Gauthier [Internett]. Atcc.org. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.atcc.org/search#q=Pseudoalteromonas%20sp.%20Gauthier&sort=relevancy&numberOfResults=24>
98. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 23446 [Internett]. Dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-23446>
99. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 6060 [Internett]. Dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-6060>
100. German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH: 16809 [Internett]. Dsmz.de. [siteret 2022]. Hentet fra: <https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/DSM-16809>
101. Burke C, Thomas T, Lewis M, Steinberg P, Kjelleberg S. Composition, uniqueness and variability of the epiphytic bacterial community of the green alga *Ulva australis*. *The ISME Journal*. 2010;5(4):590-600.
102. Bengtsson M, Sjøtun K, Lanzén A, Øvreås L. Bacterial diversity in relation to secondary production and succession on surfaces of the kelp *Laminaria hyperborea*. *The ISME Journal*. 2012;6(12):2188-2198.
103. Østgaard K. Enzymatic microassay for the determination and characterization of alginates. *Carbohydrate Polymers*. 1992;19(1):51-59.

VEDLEGG

VEDLEGG 1 – PRØVEOVERSIKT

VEDLEGG 2 – VEIESKJEMA

VEDLEGG 3 – OPPSETT KARBONKILDE-SCREENING

VEDLEGG 4 – KONSENTRASJONSMÅLINGER

**VEDLEGG 5 – BILDER AV ISOLATENE DYRKET PÅ
MARINE BROTH AGAR**

**VEDLEGG 6 – VEKSTKURVER FRA KARBONKILDE
-SCREENING**

**VEDLEGG 7 – MÅLINGER OG OBSERVASJONER FRA
KARBONKILDE-SCREENING**

VEDLEGG 8 – PROTOKOLLER

VEDLEGG 9 – FARE OG SIKKERHETSSETNINGER

VEDLEGG 10 - RISIKOVURDERING

VEDLEGG 1 – PRØVEOVERSIKT

Tabell 1.1 Oversikt over isolatene benyttet under bacheloroppgaven. Tabellen viser i tillegg hvilken tareart isolatet er isolert fra, hvilken del av planten og hvor tareplanten er høstet. De ble isolert genomisk DNA fra alle de opplistede isolatene. Kun isolatene som er markert ble benyttet under karbonkilde-screening.

Isolatnummer	Forsøk	Tareart	Del av plante
1	Aure	Martaum	Hele
3	Aure	Martaum	Hele
5	Aure	Martaum	Hele
6	Aure	Martaum	Hele
7	Aure	Blæretang	Hele
9	Aure	Blæretang	Hele
11	Aure	Grisetang	Hele
13	Aure	Grisetang	Hele
14	Aure	Grisetang	Hele
16	Aure	Sagtang	Hele
19	Aure	Sagtang	Hele
22	Aure	Rødalge på sagtang	Hele
23	Aure	Rødalge på sagtang	Hele
24	Aure	Rødalge på sagtang	Hele
27	Grip	SL 5	Midt
31	Grip	SL 6	Rot
32	Grip	SL 6	Midt
39	SES3	AE	Rot
41	SES3	AE	Rot
42	SES3	AE	Rot
43	SES3	AE	Midt
45a	SES3	AE	Opp
49	SES3	AE	Rot
51	SES3	AE	Midt
52	SES3	AE	Midt
58	SES3	SL	Midt
59	SES3	SL	Midt
66	SES3	SL	Midt
68	SES3	SL	Opp
71	SES1 + SES2	AE	Rot
72	SES1 + SES2	AE	Rot
75	SES1 + SES2	1 SL	Rot
77a	SES1 + SES2	1 SL	Rot
78	SES1 + SES2	1 SL	Rot
79a	SES1 + SES2	1 SL	Ned
79	SES1 + SES2	1 SL	Ned
85	SES1 + SES2	2 SL	Rot
86	SES1 + SES2	2 SL	Rot
88	SES1 + SES2	2 SL	Rot
89	SES1 + SES2	2 SL	Ned
90	SES1 + SES2	2 SL	Ned
93	SES1 + SES2	2 SL	Midt
94	SES1 + SES2	2 SL	Midt
95	SES1 + SES2	2 SL	Midt
96	SES1 + SES2	2 SL	Midt
97	SES1 + SES2	2 SL	Opp

VEDLEGG 2 – VEIESKJEMA

Tabellene nedenfor viser veieskjema for henholdsvis Marine Broth agar og Marine Broth dyrkningsmedium. For å få løst Marin Broth ble mediet varmet opp til kokepunkt. Mediene ble autoklavert ved 120 °C i 20 minutter.

Marine Broth agar

Tabell 2.1 Veieskjema for Marin Broth agar brukt under gjennomføringen av prosjektet. Tabellen viser komponentene, hvor mye som skulle veies ut av komponenter i forhold til mengde medium, mengden som faktisk ble veid ut, forhandler av kjemikalie, lotnummer, artikkelnummer og signatur av personen som lagde mediet.

Komponent	g/L	Vei ut	Veid ut	Forhandler	Lot.nr/Artikkel nr.	Signatur
Marine Broth	37,40	29,92	29,92	BD Difco	279110/9294142	KH
Agar	20,00	16	16,01	Oxoid	LP0011/4267121	KH
Ionefritt vann	1000	800	800,03			KH

Marine Broth dyrkningsmedium






Tabell 2.2 Veieskjema for Marin Broth brukt under gjennomføringen av prosjektet. Tabellen viser komponentene, hvor mye som skulle veies ut av komponenter i forhold til mengde medium, mengden som faktisk ble veid ut, forhandler av kjemikalie, lotnummer, artikkelnummer og signatur av personen som lagde mediet.

Komponent	g/L	Vei ut	Veid ut	Forhandler	Lot.nr/Artikkel nr.	Signatur
Marine Broth	37,40	29,92	29,924	BD Difco	279110/9294142	KH
Ionefritt vann	1000	800	800,00			KH

VEDLEGG 4 – OPPSETT KARBONKILDE-SCREENING

Nedenfor er brønnplateoversikten for karbonkilde-screening gitt. Figurene viser brønnplate-nummeret, hvilke isolater som er inokulert i hver brønn, og hvilke karbonkilder som er benyttet.

Dyrkingsmediene er fargekodet i figurene, hvor:

-  Marine Broth
-  Marine Broth tilsatt 2 g/L mannitol
-  Marine Broth tilsatt 2 g/L laminaran
-  Marine Broth tilsatt 2 g/ alginat
-  Marine Broth tilsatt 2 g/L fucoidan

BP 2

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	72	72	77a	77a	72	72	77a	77a
B	79	79	85	85	79	79	85	85
C	86	86	88	88	86	86	88	88
D	90	90	93	93	90	90	93	93
E	94	94	96	96	94	94	96	96
F	97	97			97	97		

Figur 3.1 Brønnplate 2 med isolat 72-97. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L mannitol.

BP 3

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	1	9	9	11	11	14	14
B	19	19	22	22	23	23		
C	1	1	9	9	11	11	14	14
D	19	19	22	22	23	27		
E	1	1	9	9	11	11	14	14
F	19	19	22	22	23	23		

Figur 3.2 Brønnplate 3 med isolat 1-23. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L mannitol og 2 g/L laminaran

BP 4

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	27	27	32	32	27	27	32	32
B	39	39	41	41	39	39	41	41
C	43	43	45a	45a	43	43	45a	45a
D	52	52	58	58	52	52	58	58
E	59	59	66	66	59	59	66	66
F	68	68			68	68		

Figur 3.3 Brønnplate 4 med isolat 27-68. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L mannitol.

BP 5

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	27	27	32	32	27	27	32	32
B	39	39	41	41	39	39	41	41
C	43	43	45a	45a	43	43	45a	45a
D	52	52	58	58	52	52	58	58
E	59	59	66	66	59	59	66	66
F	68	68			68	68		

Figur 3.4 Brønnplate 5 med isolat 27-68. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L laminaran.

BP 6

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	72	72	77a	77a	72	72	77a	77a
B	79	79	85	85	79	79	85	85
C	86	86	88	88	86	86	88	88
D	90	90	93	93	90	90	93	93
E	94	94	96	96	94	94	96	96
F	97	97			97	97		

Figur 3.5 Brønnplate 6 med isolat 72-97. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L laminaran.

BP 7

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	1	9	9	1	1	9	9
B	11	11	14	14	11	11	14	14
C	19	19	22	22	19	19	22	22
D	23	23	27	27	23	23	27	27
E	32	32	39	39	32	32	39	39
F	41	41			41	41		

Figur 3.6 Brønnplate 7 med isolat 1-41. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L alginat.

BP 8

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	43	43	45a	45a	43	43	45a	45a
B	52	52	58	58	52	52	58	58
C	59	59	66	66	59	59	66	66
D	68	68	72	72	68	68	72	72
E	77a	77a	79	79	77a	77a	79	79
F	85	85			85	85		

Figur 3.7 Brønnplate 8 med isolat 43-85. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L alginat.

BP 9

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	86	86	88	88	90	90	93	93
B	94	94	96	96	97	97		
C	86	86	88	88	90	90	93	93
D	94	94	96	96	97	97		
E	86	86	88	88	90	90	93	93
F	94	94	96	96	97	97		

Figur 3.8 Brønnplate 9 med isolat 86-97. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L alginat og fucoidanl.

BP 10

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	1	9	9	1	1	9	9
B	11	11	14	14	11	11	14	14
C	19	19	22	22	19	19	22	22
D	23	23	27	27	23	23	27	27
E	32	32	39	39	32	32	39	39
F	41	41			41	41		

Figur 3.9 Brønnplate 10 med isolat 1-41. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L fucoidan.

BP 11

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	43	43	45a	45a	43	43	45	45
B	52	52	58	58	52	52	58	58
C	59	59	66	66	59	59	66	66
D	68	68	72	72	68	68	72	72
E	77a	77a	79	79	77a	77a	79	79
F	85	85			85	85		

Figur 3.10 Brønnplate 11 med isolat 43-85. Dyrket i Marine Broth og Marine Broth med 2 g/L fucoidan.

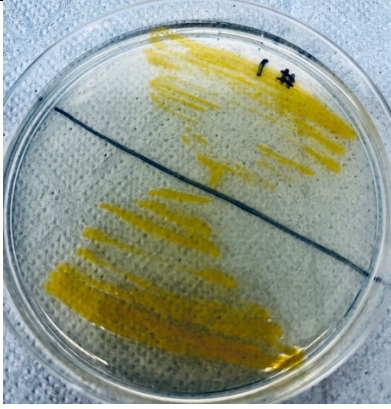
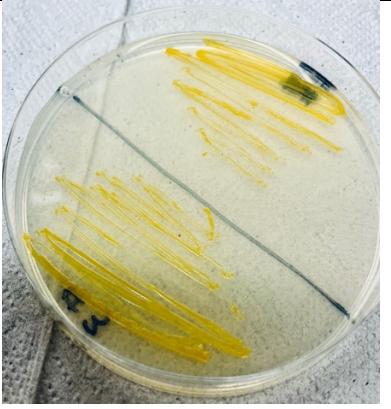
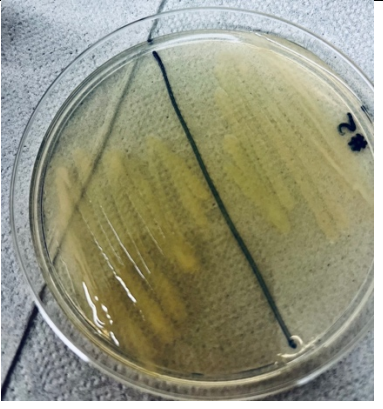
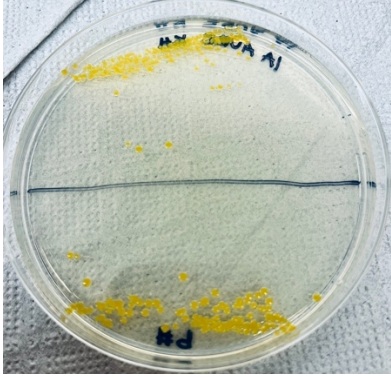
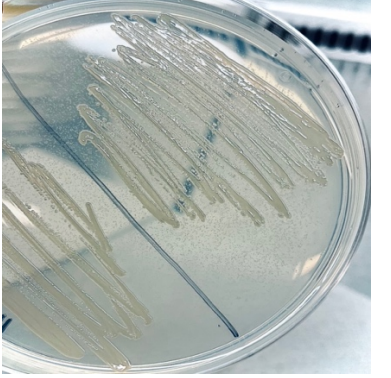
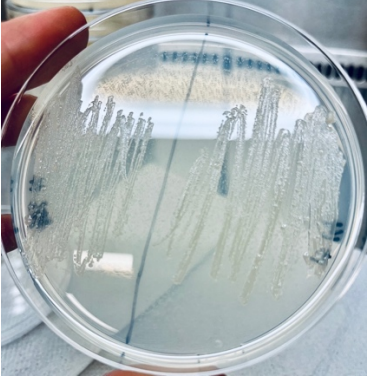
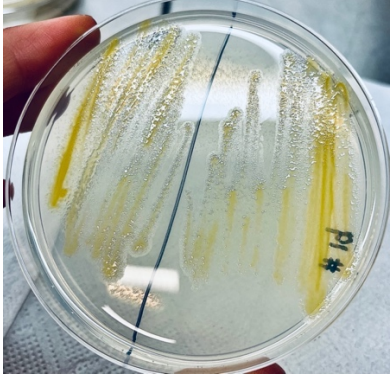
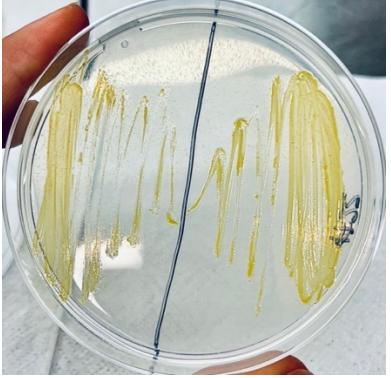
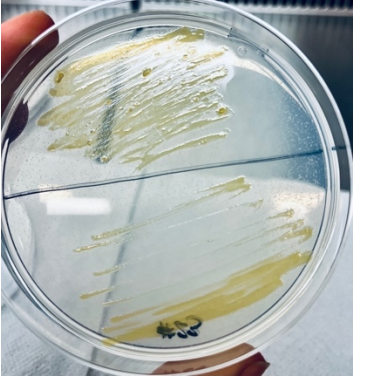
VEDLEGG 4 – KONSENTRASJONSMÅLINGER

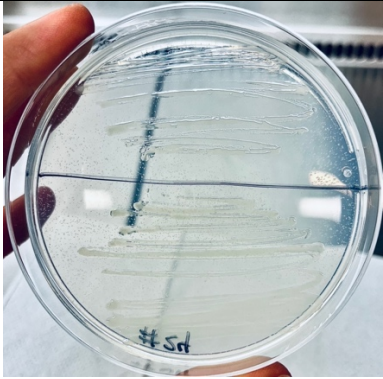
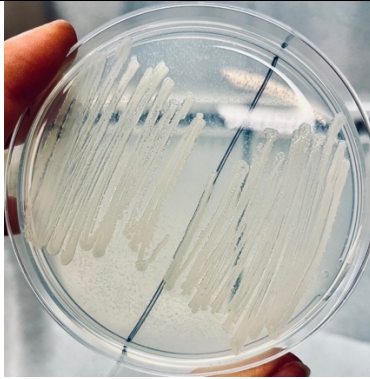
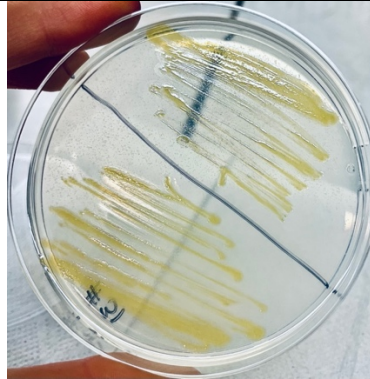
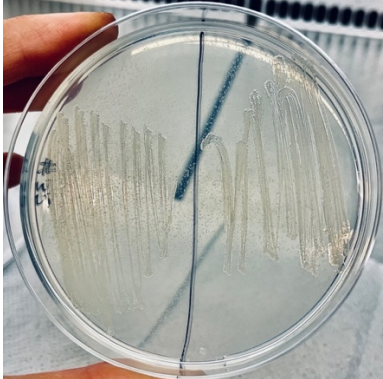
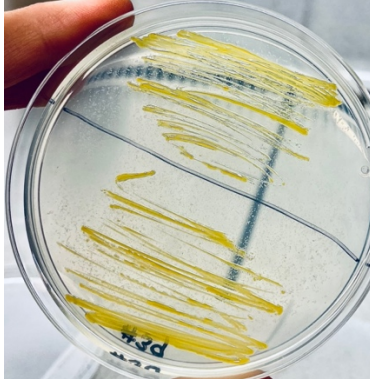

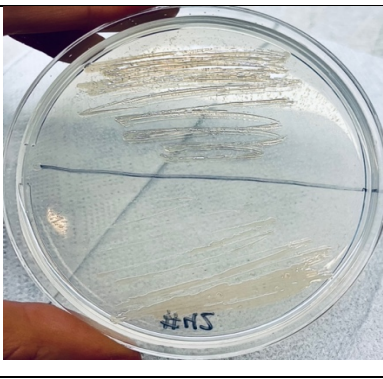
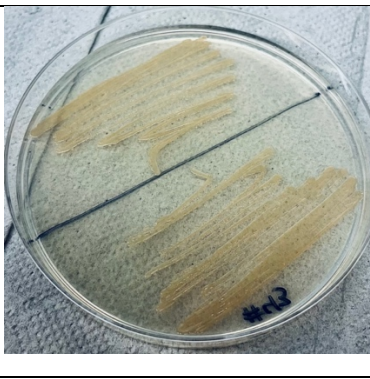
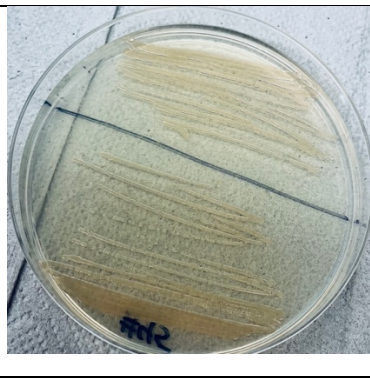
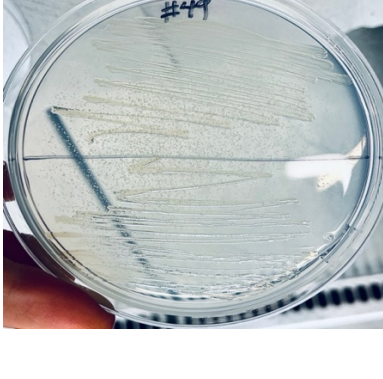
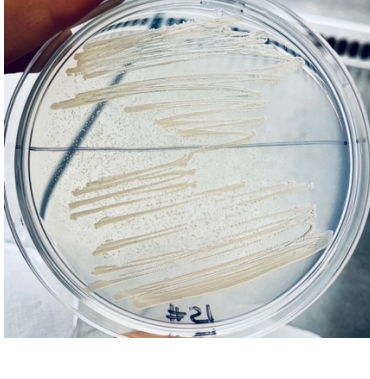
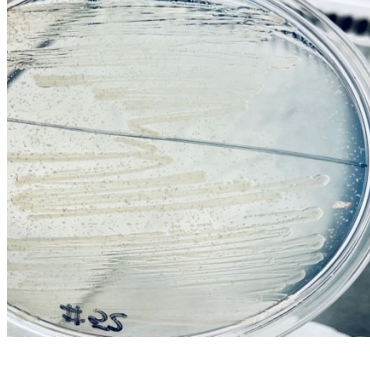
Tabell 4.1 Konsentrasjonsverdier, absorbans og renhetsverdier etter isolering av genomisk DNA og etter rensing av PCR produkt.

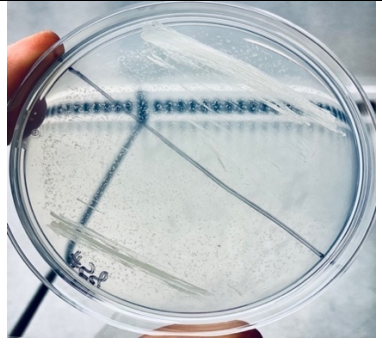

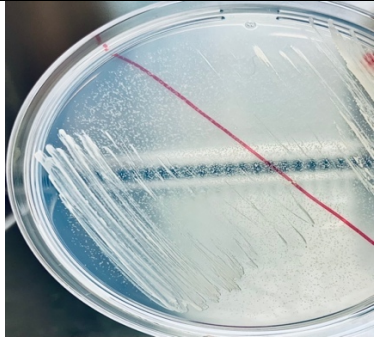
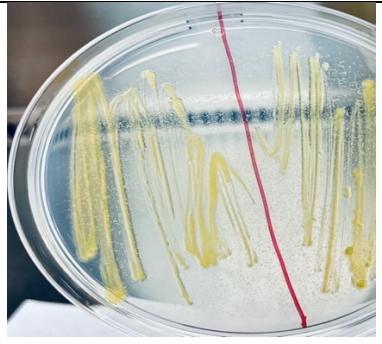


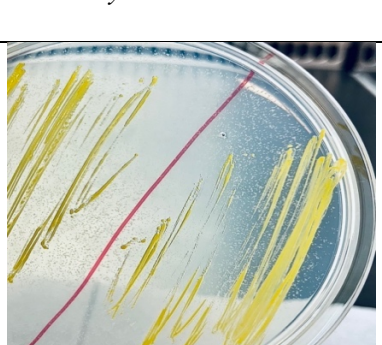
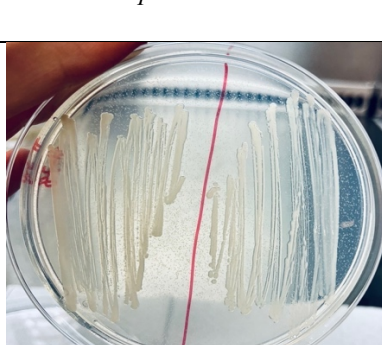
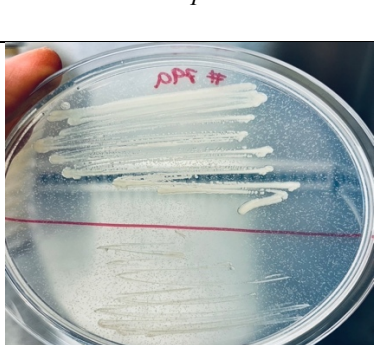
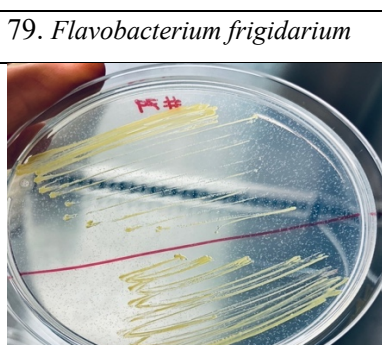

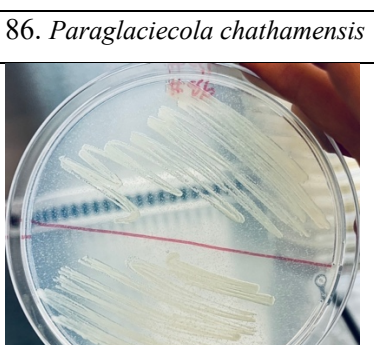
Isolat nr.	Etter isolering av genomisk DNA				Etter rensing av PCR produkt	
	Konsentrasjon (ng/μl)	A260	260/230	260/280	Konsentrasjon (ng/μl)	260/230
1	257,69	4,95	2,20	1,92	65,19	Ok
3	398,22	7,96	2,18	1,91	86,32	Ok
5	137,25	2,75	2,30	1,93	85,12	Ok
6	144,73	2,89	2,15	1,95	91,17	Ok
7	150,00	3,00	1,78(!)	1,99	84,92	Ok
9	303,98	6,08	1,95	1,91	96,73	Ok
11	214,45	4,29	1,85	1,95	88,86	Ok
13	450,80	9,02	1,95	1,96	85,85	Ok
14	619,48	12,39	2,01	1,99	83,17	Ok
16	693,82	13,88	2,06	2,01	42,79	Ok
19	441,75	8,83	2,16	1,93	64,83	Ok
22	259,84	5,19	2,03	1,95	59,61	Ok
23	430,67	8,61	2,12	1,92	81,59	Ok
24	576,89	11,54	1,94	1,95	73,50	Ok
27	344,88	6,89	1,99	1,97	72,62	Ok
31	371,23	7,42	2,01	1,97	47,65	Ok
32	611,48	12,23	1,90	1,97	77,27	Ok
39	590,13	11,80	1,86	1,95	65,47	Ok
41	433,71	8,67	1,96	1,94	76,45	Ok
42	301,22	6,02	1,92	1,93	82,49	Ok
43	27,19	0,54	0,96(!)	1,96	68,46	Ok
45a	397,08	7,94	2,08	1,97	83,94	Ok
49	486,23	9,72	2,11	1,94	107,42	Ok
51	416,79	8,34	1,97	1,91	89,39	Ok
52	464,09	9,28	2,08	1,93	64,72	Ok
58	393,67	7,87	1,92	1,96	58,33	Ok
59	488,98	9,78	1,86	1,86	102,17	1,14!
66	357,90	7,16	1,77(!)	1,92	97,30	1,59!
68	786,58	15,73	2,02	1,90	91,60	1,53!
71	265,99	5,32	1,74(!)	1,94	61,33	Ok
72	357,93	7,16	2,04	1,96	74,34	Ok
75	258,42	5,17	1,84	1,95	73,09	Ok
77a	262,30	5,25	1,99	1,92	70,26	Ok
78	476,88	9,54	2,07	1,96	75,10	Ok
79	392,09	7,84	2,04	1,93	43,44	Ok
79a	273,16	5,46	1,87	1,97	39,06	Ok
85	325,60	6,51	1,97	1,97	43,09	Ok
86	340,20	6,80	1,83	2,03	24,93	Ok
88	428,01	8,56	1,84	2,00	44,65	Ok
89	157,38	3,15	1,78(!)	1,98	88,23	Ok
90	258,19	5,16	2,01	1,95	65,04	Ok
93	433,39	8,67	2,05	1,99	56,99	Ok
94	339,03	6,78	1,92	1,97	52,64	Ok
95	431,39	8,63	2,09	1,93	56,26	Ok
96	310,22	6,20	2,07	1,97	64,94	Ok
97	347,74	6,95	2,04	1,96	89,02	Ok

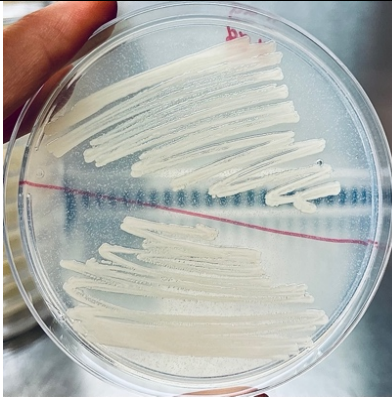
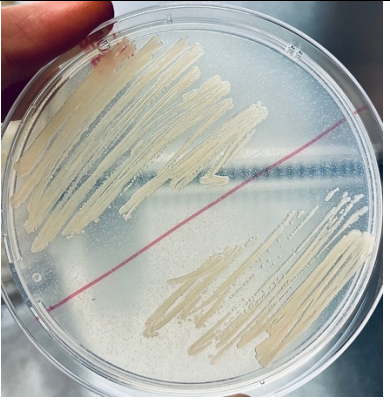
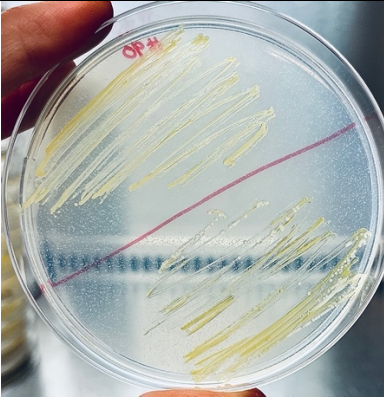

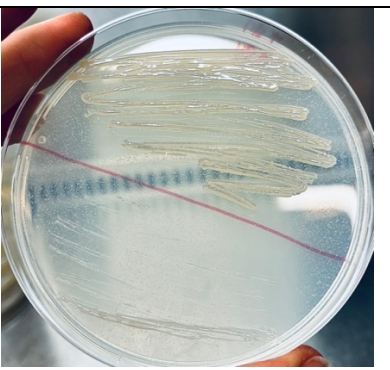
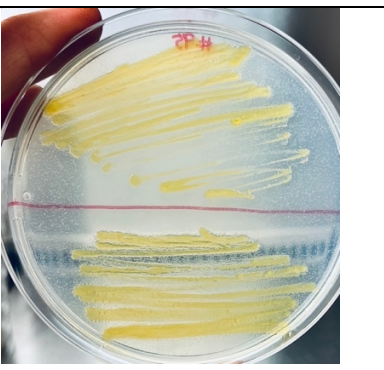
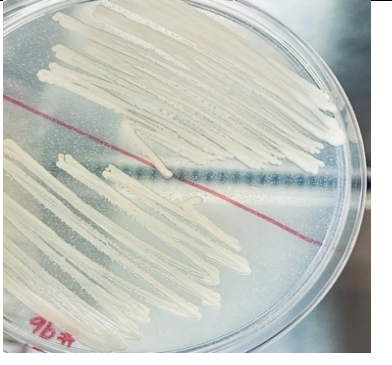

VEDLEGG 5 – BILDER AV ISOLATENE DYRKET PÅ MARINE BROTH AGAR

Under presenteres bildene tatt av agarplatene etter dyrking på Marine Broth Agar. Isolatene som ble identifisert ved sekvensering av 16S-rDNA er inkludert.

<p>1. <i>Cellulophaga sp. An110</i></p> 	<p>3. <i>Algibacter sp. Ld13</i></p> 	<p>5. <i>Vibrio alginolyticus</i></p> 
<p>9. <i>Algibacter lectus</i></p> 	<p>11. <i>Pseudoalteromonas aliena</i></p> 	<p>14. <i>Marinomonas gallaica</i></p> 
<p>19. <i>Cellulophaga fucicola</i></p> 	<p>22. <i>Algibacter lectus</i></p> 	<p>23. <i>Cellulophaga sp. An110</i></p> 

24. <i>Vibrio alginolyticus</i>	27. <i>Pseudoalteromonas</i> sp.	31. <i>Cellulophaga</i> sp. An66
		
32. <i>Paraglaucicola mesophilia</i>	39. <i>Algibacter miyuki</i>	41. <i>Olleya mesophilus</i>
		
42. <i>Shewanella livingstonensis</i>	43. <i>Shewanella baltica</i>	45a. <i>Shewanella japonica</i>
		
49. <i>Vibrio</i> sp. V632	51. <i>Shewanella</i> sp. STAB101	52. <i>Pseudoalteromonas distincta</i>
		

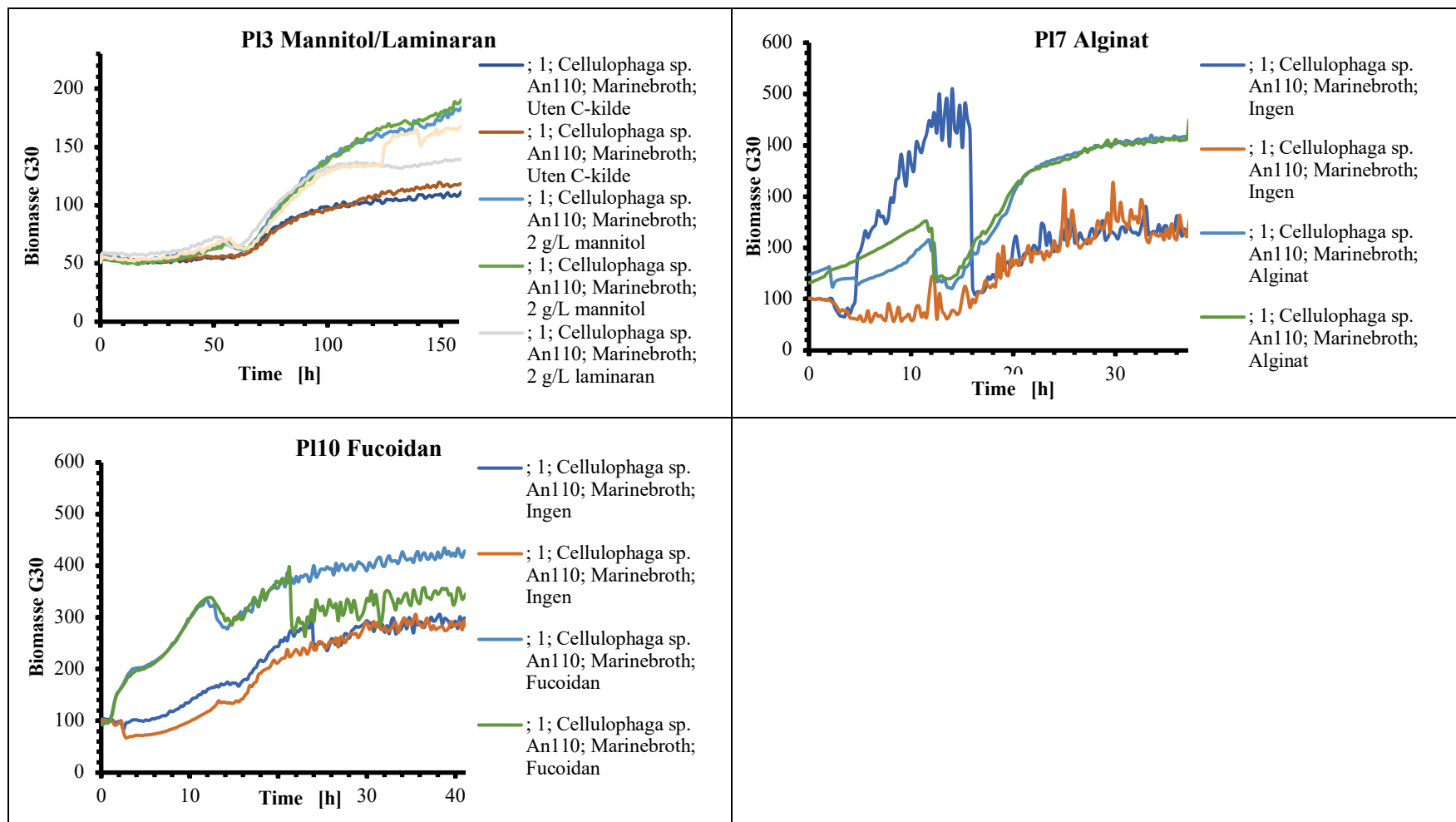
58. <i>Sulfitobacter</i> sp. KS8-4	59. <i>Cellulophaga fucicola</i>	66. <i>Sulfitobacter</i> sp. KS8-4
		
68. <i>Cellulophaga baltica</i>	72. <i>Lacinutrix ilipiscaria</i>	75. <i>Shewanella</i> sp. KASP32
		
77a. <i>Olleya namhaensis</i>	78. <i>Vibrio</i> sp.	79a. <i>Loktanella</i> sp. Lw-27b
		
79. <i>Flavobacterium frigidarium</i>	85. <i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	86. <i>Paraglaciecola chathamensis</i>
		

88. <i>Pseudoalteromonas espejiana</i>	89. <i>Shewanella ulleungensis</i>	90. <i>Polaribacter undariae</i>
		
93. <i>Pseudoalteromonas gauthier</i>	94. <i>Algoriphagus yeomjeoni</i>	95. <i>Cellulophaga sp. An66</i>
		
96. <i>Pseudoalteromonas haloplank.</i>	97. <i>Nonlabens xylanidelens</i>	
		

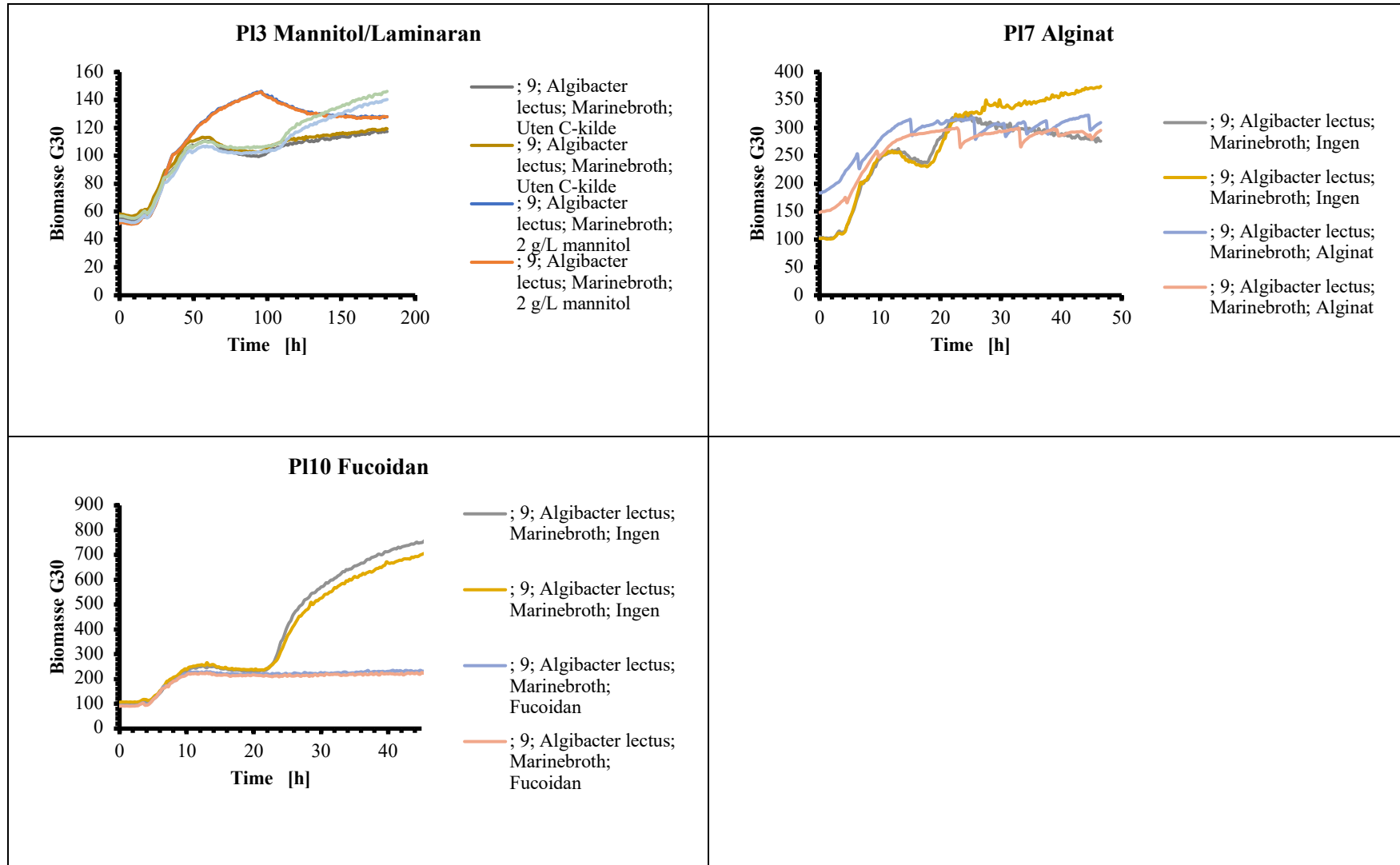
VEDLEGG 6 – VEKSTKURVER FRA KARBONKILDE-SCREENING

Her presenteres vekstkurvene som ble generert ved karbonkilde-screening i BioLector. Vekstkurvene er organisert basert på isolatnummer fra lavest til høyest. Vekstkurvene viser biomasse som funksjon av tid for 29 isolater og negativ kontroll i fem forskjellige dyrkingsmedier.

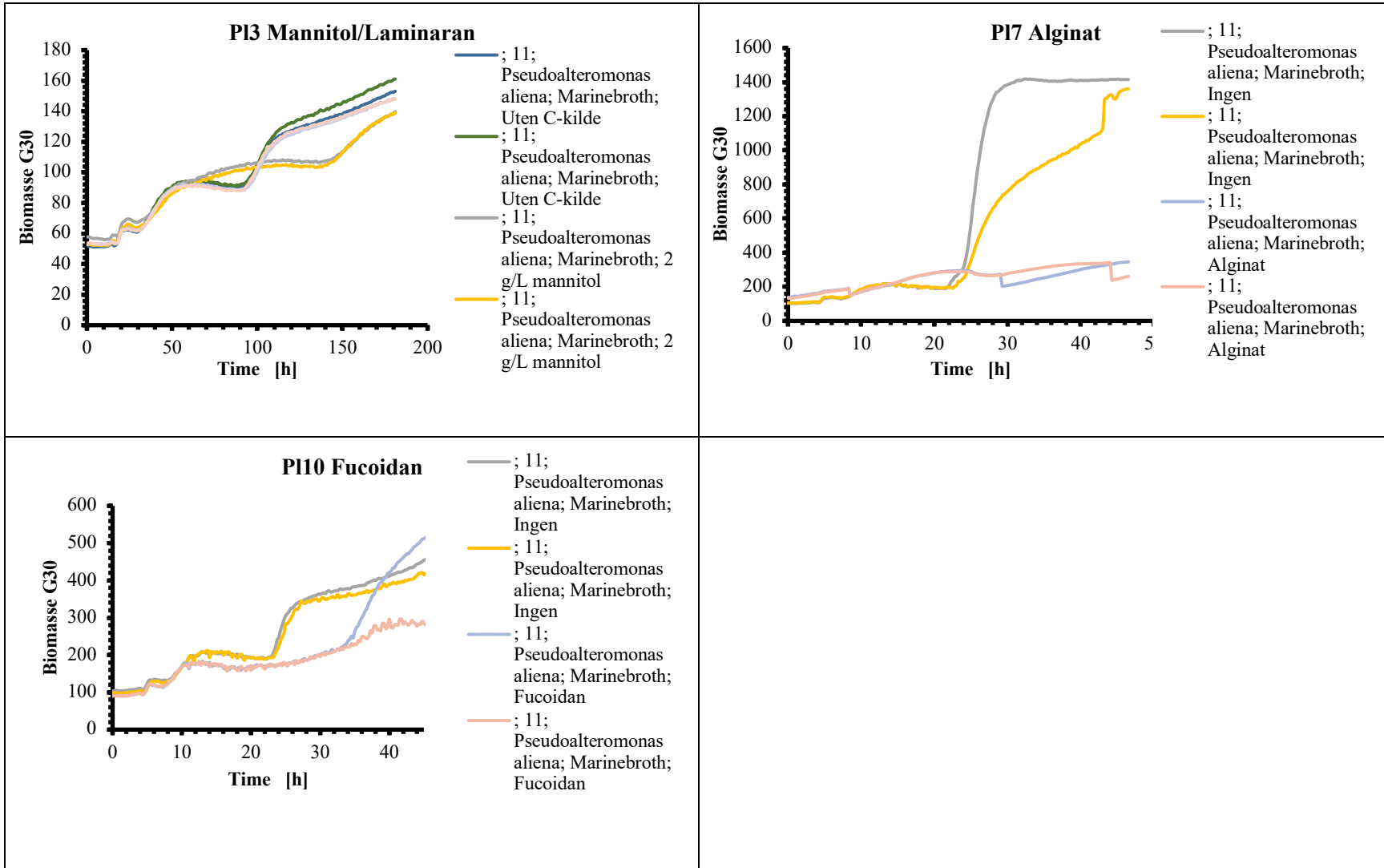
1. *Cellulophaga sp. An110*



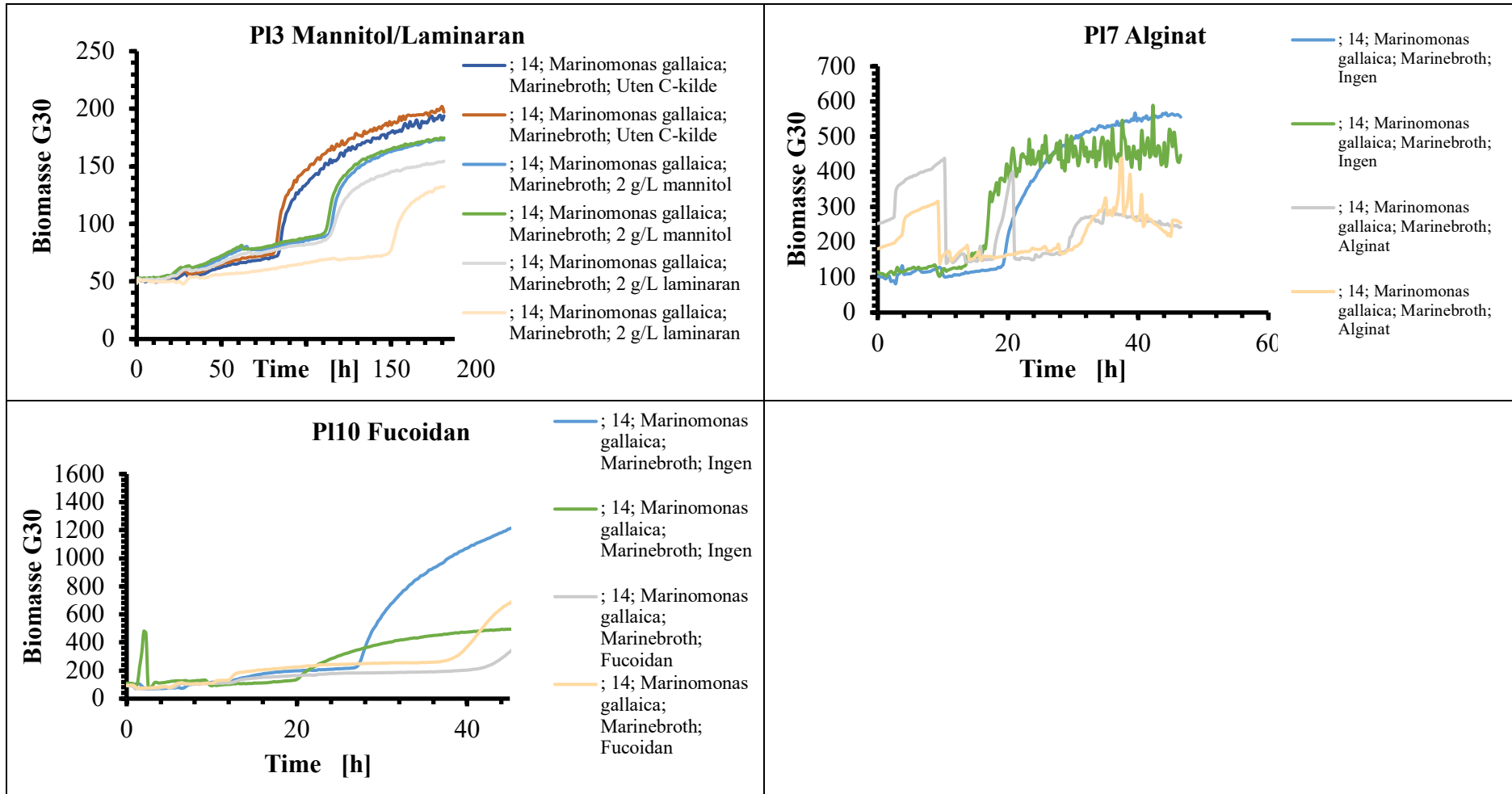
9. *Algibacter lectus*



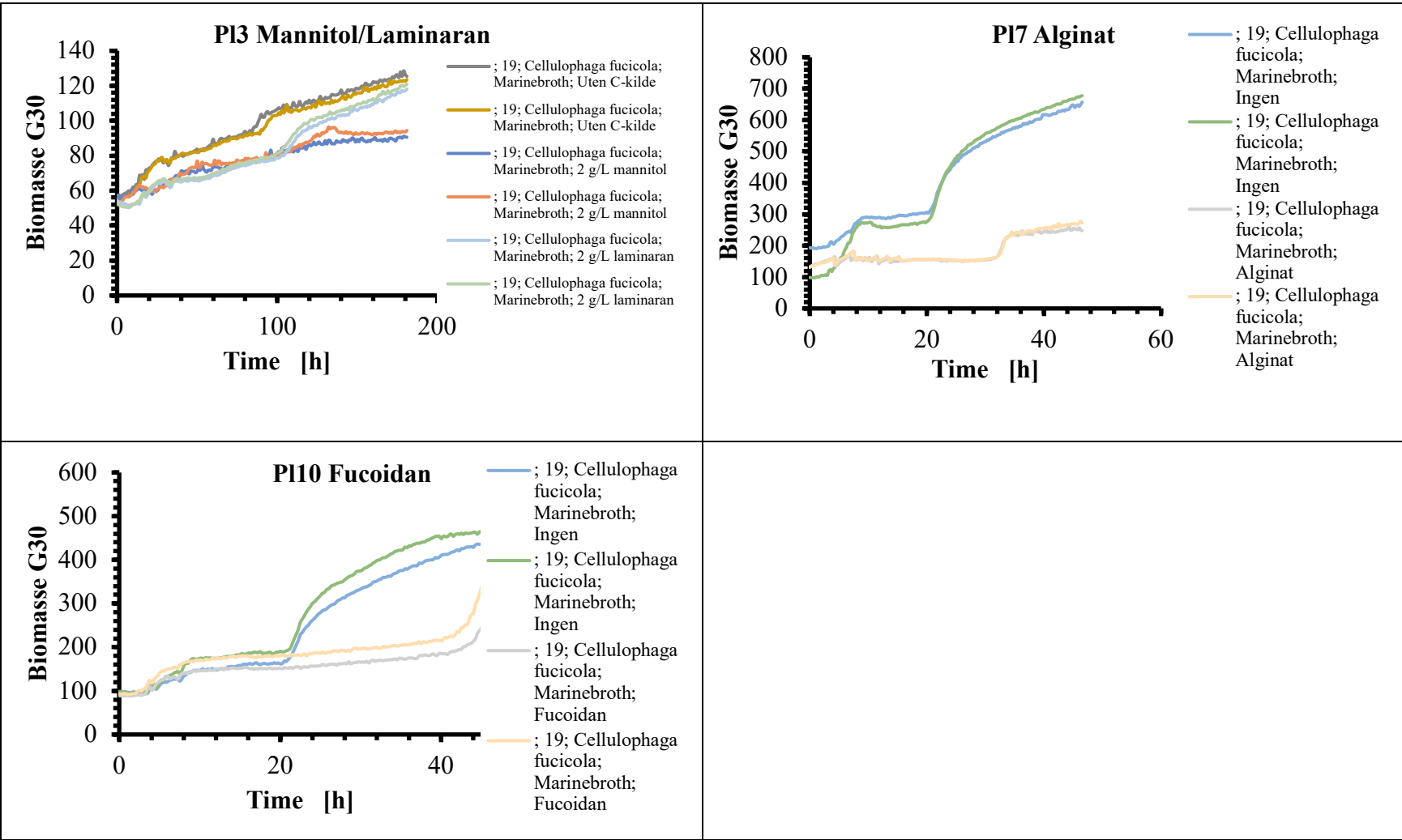
11. *Pseudoalteromonas aliena*



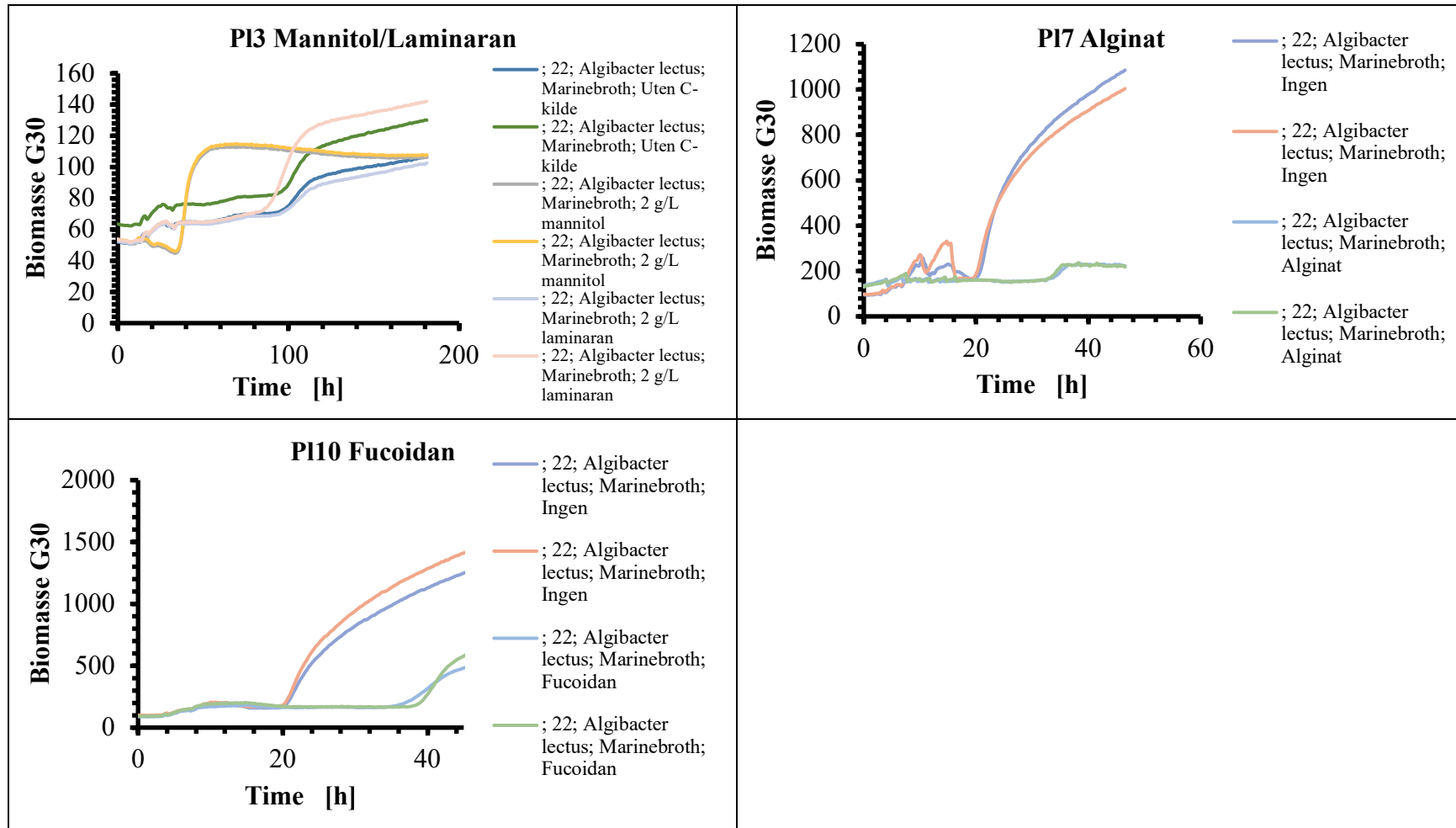
14. *Marinomonas gallaica*



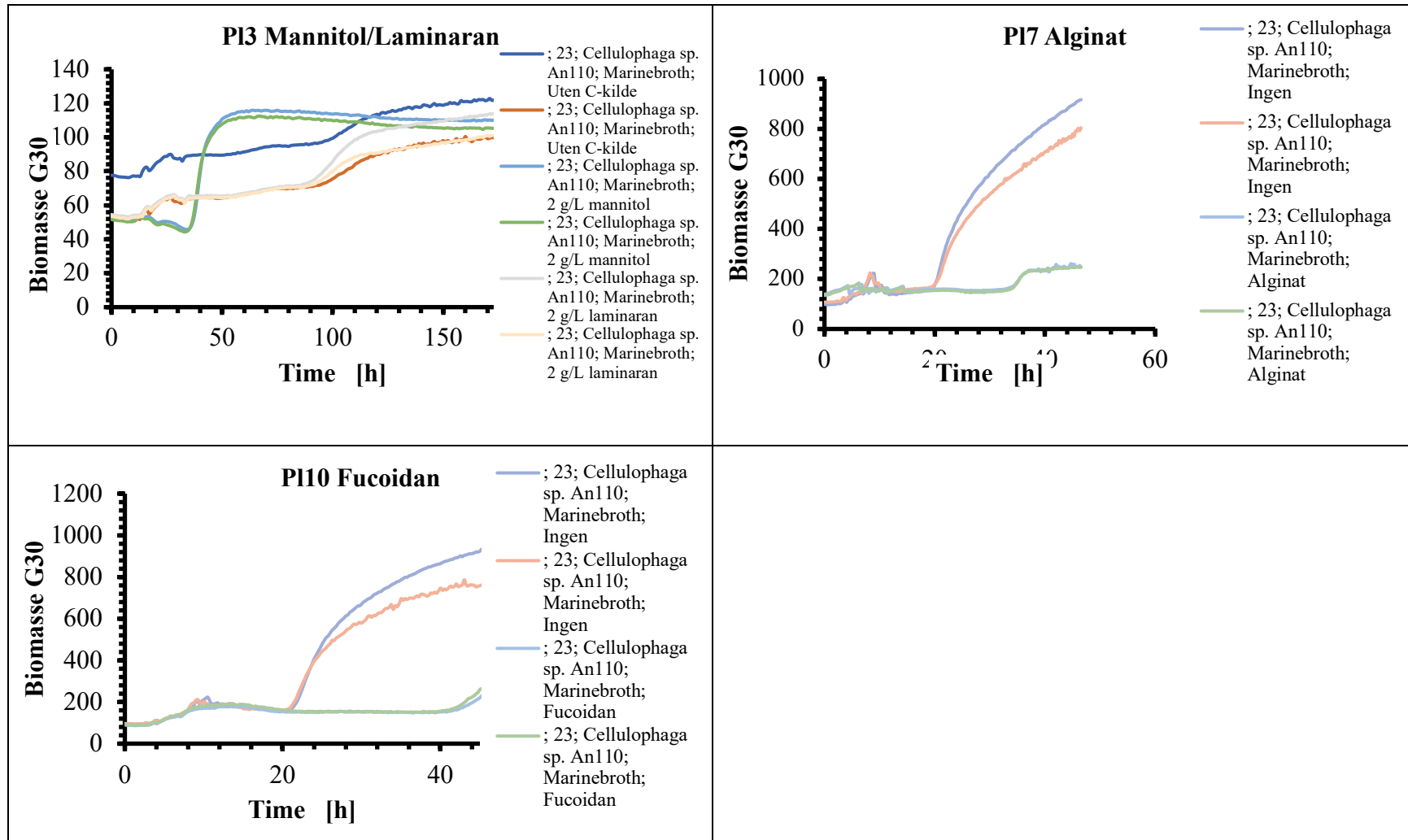
19. *Cellulophaga fucicola*



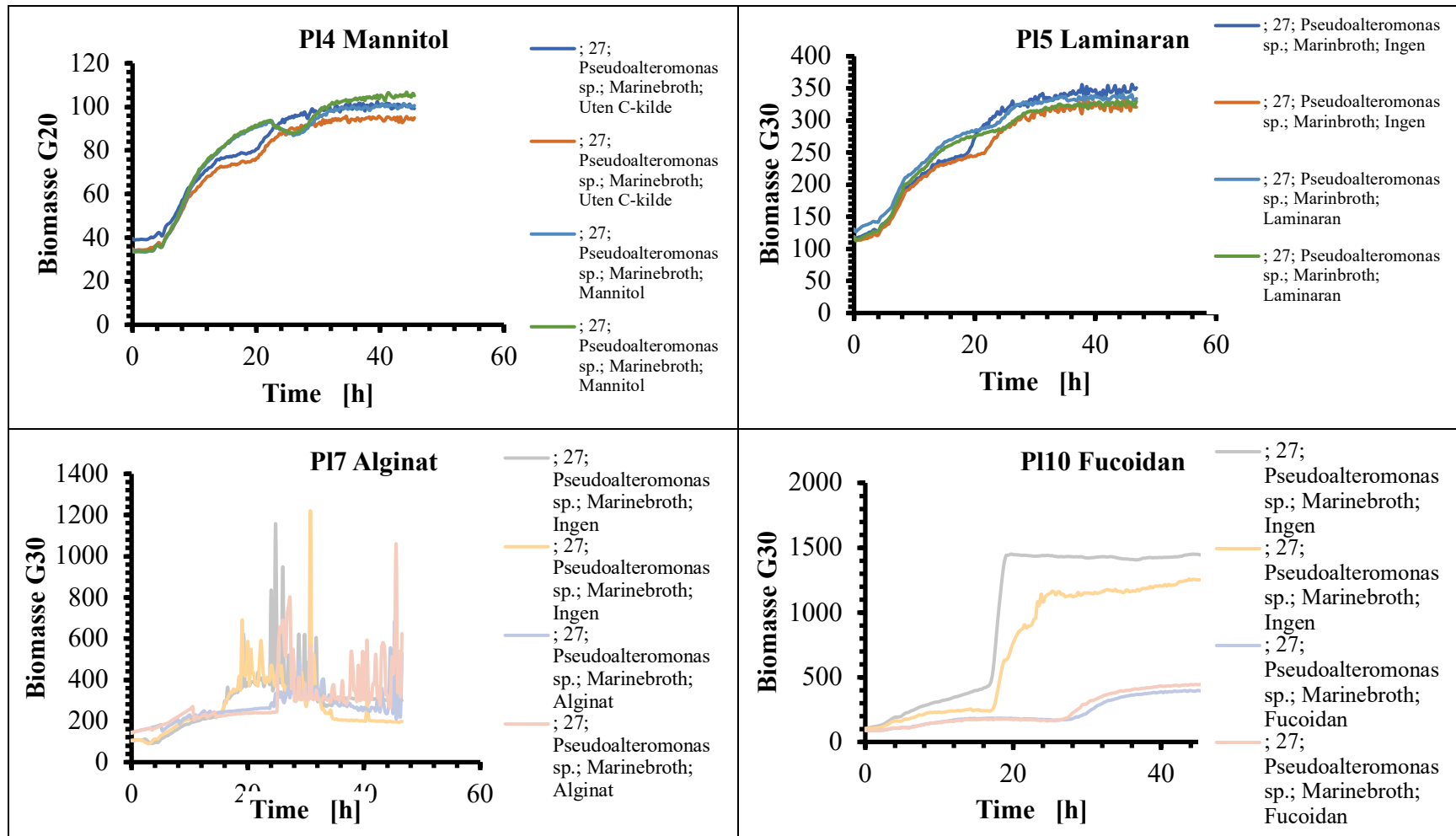
22. *Algibacter lectus*



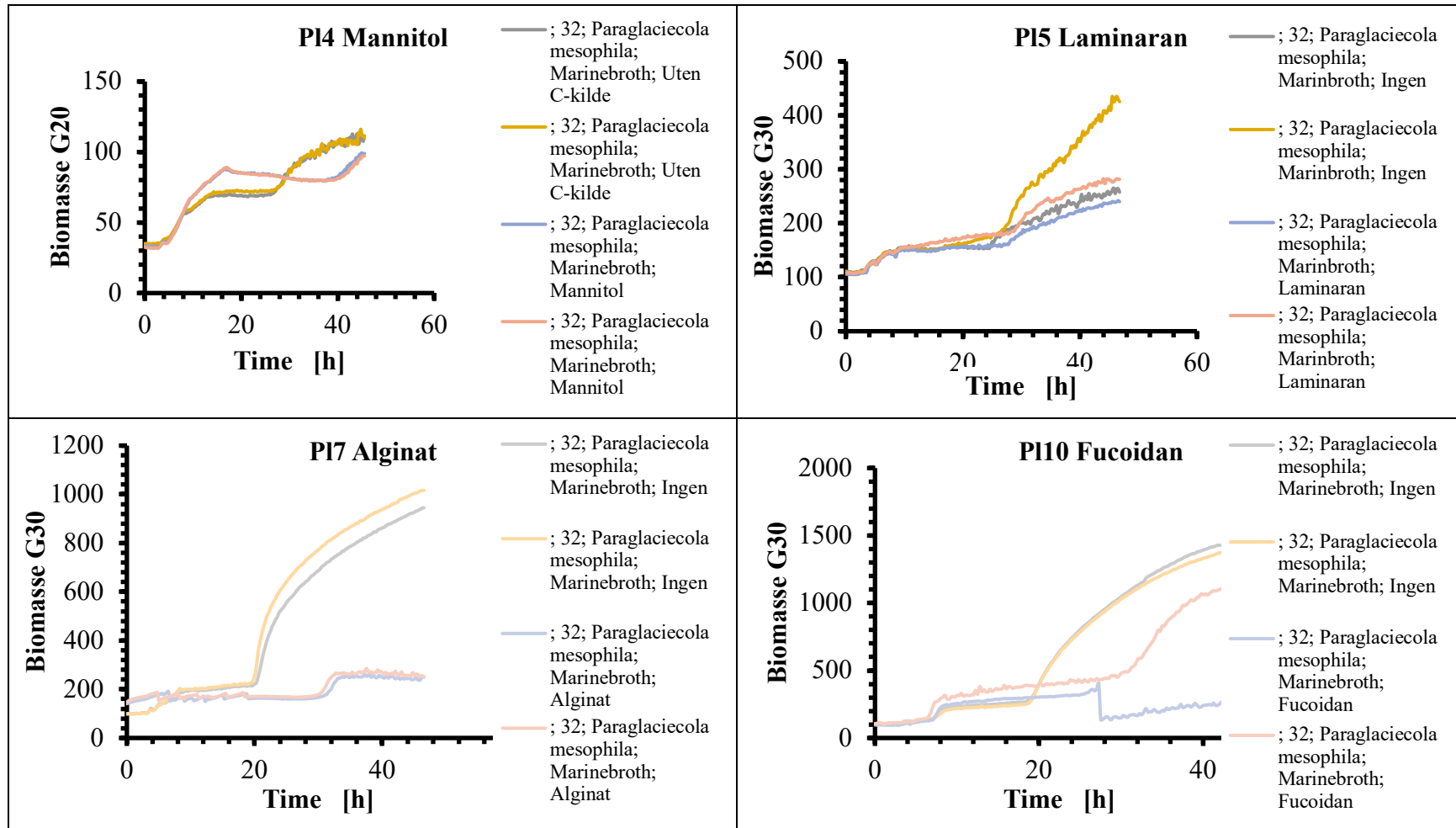
23. *Cellulophaga sp. An110*



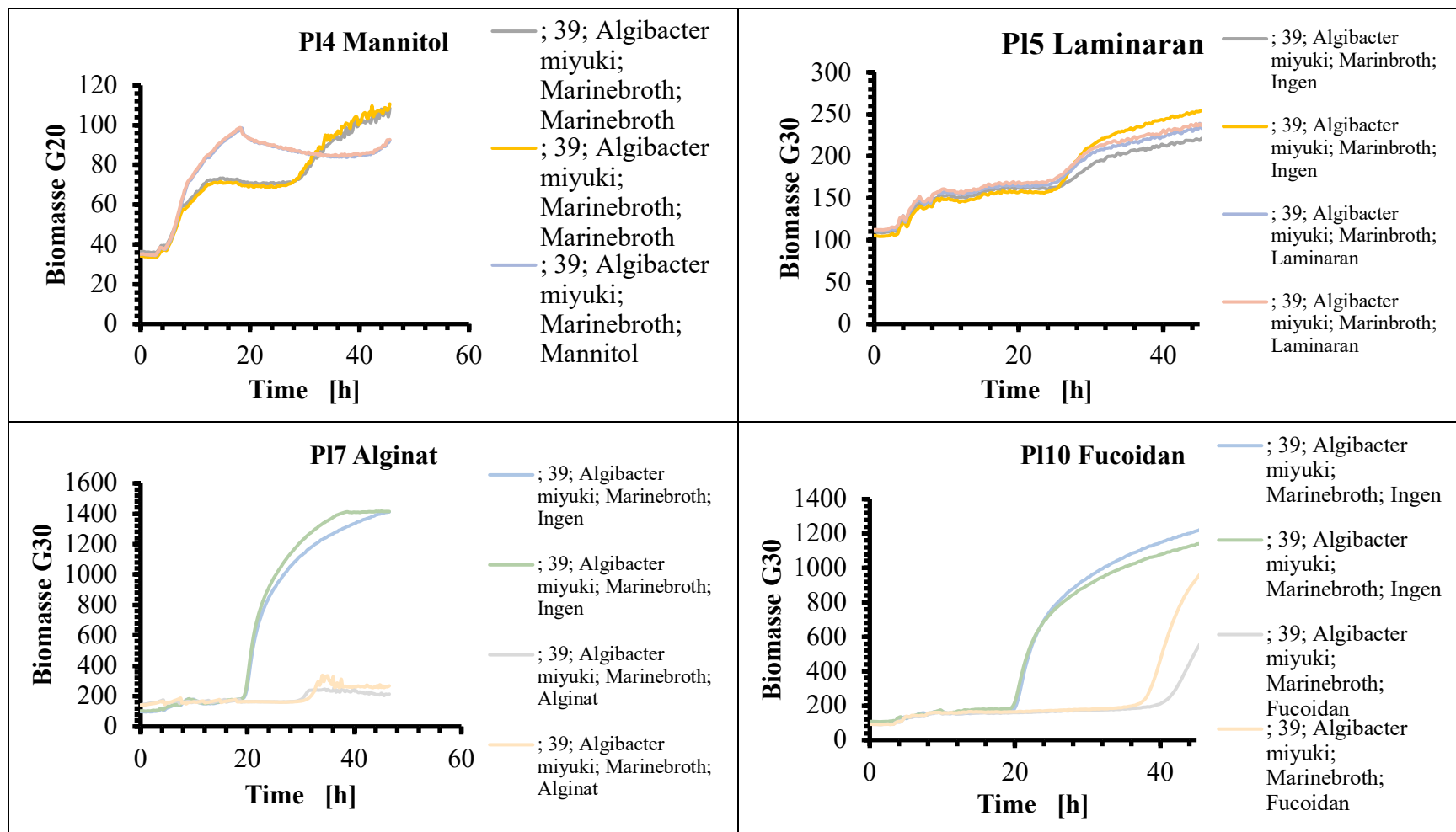
27. *Pseudoalteromonas* sp.



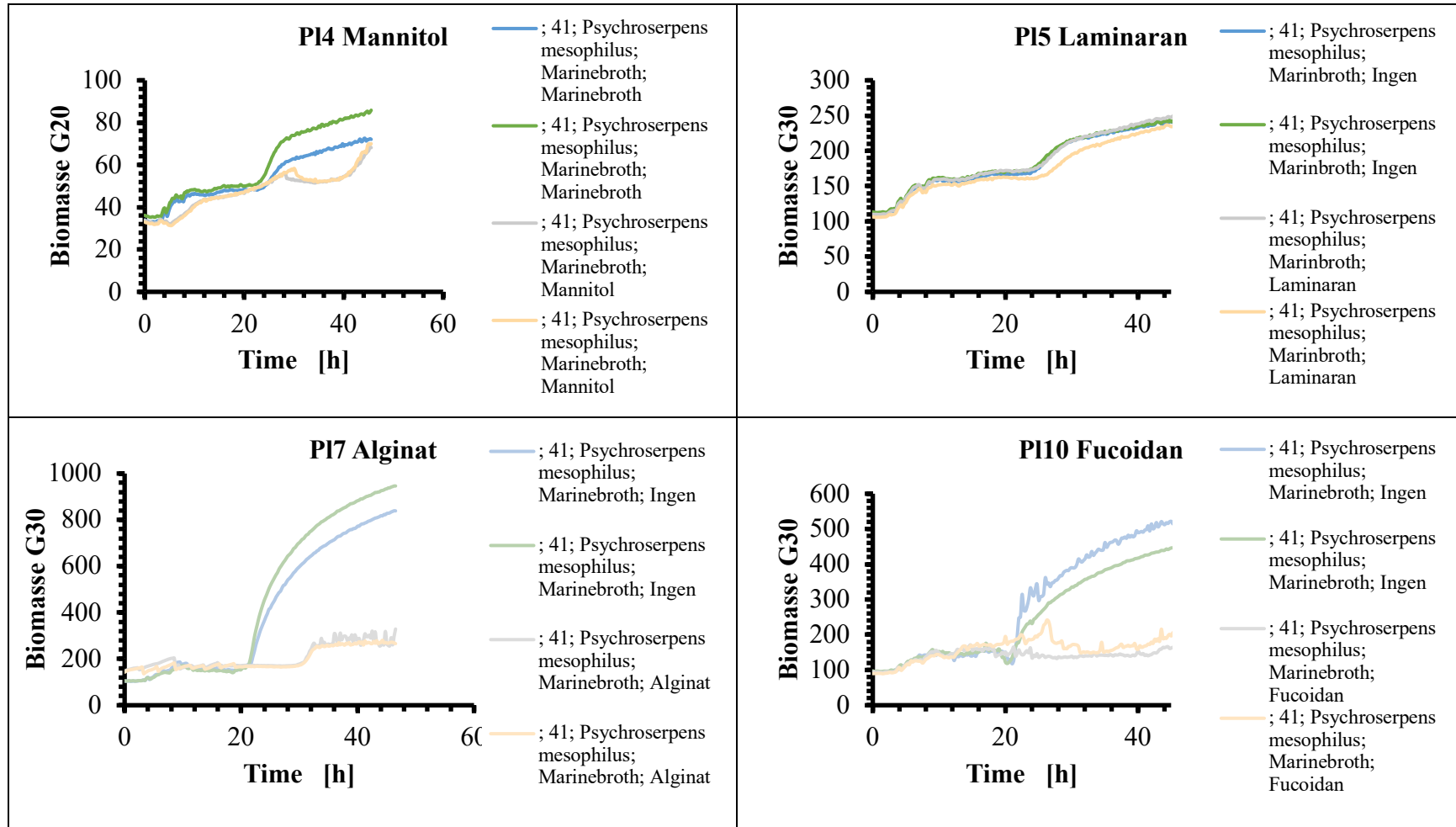
32. *Paraglaciecola mesophila*



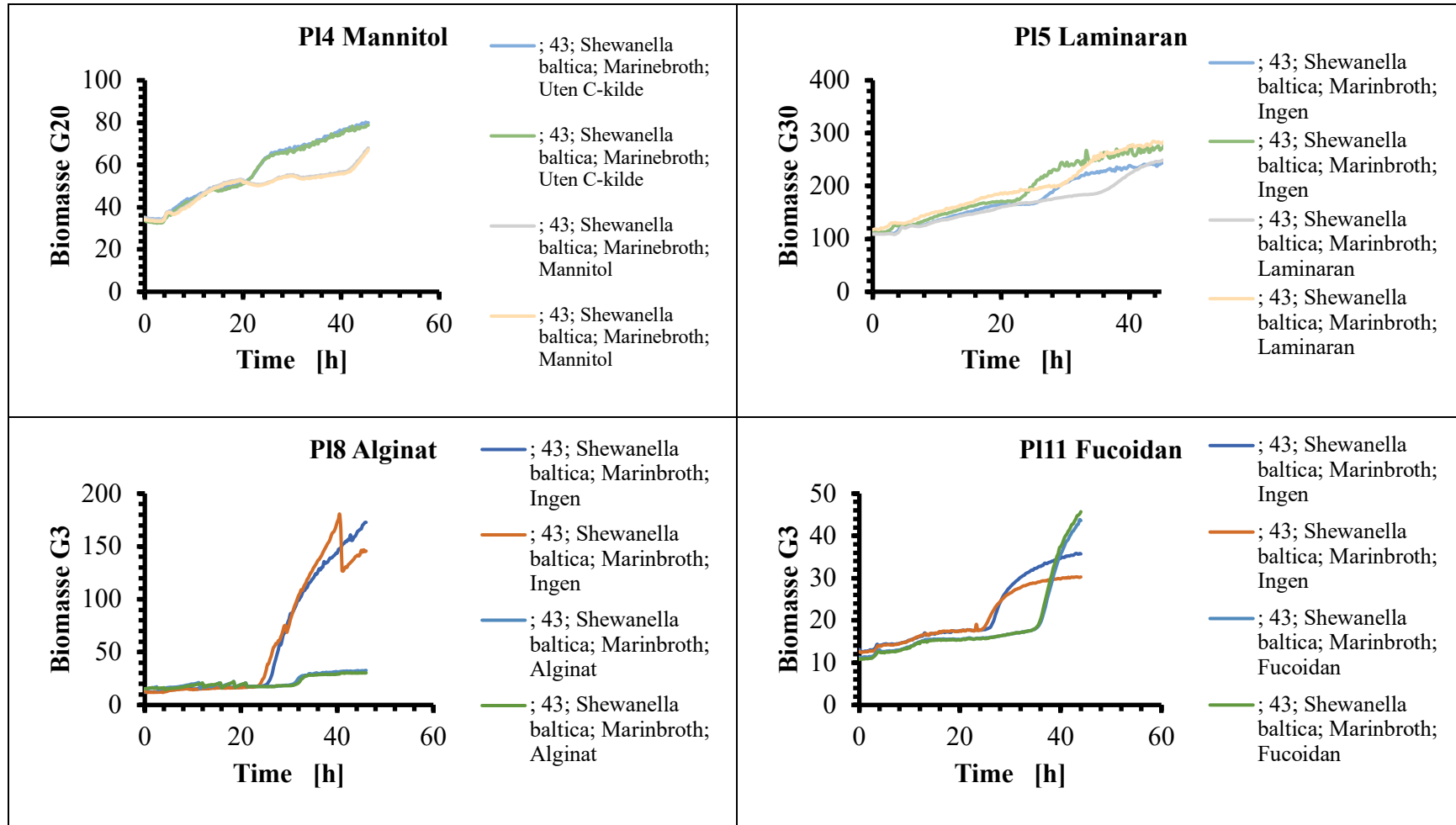
39. *Algibacter miyuki*



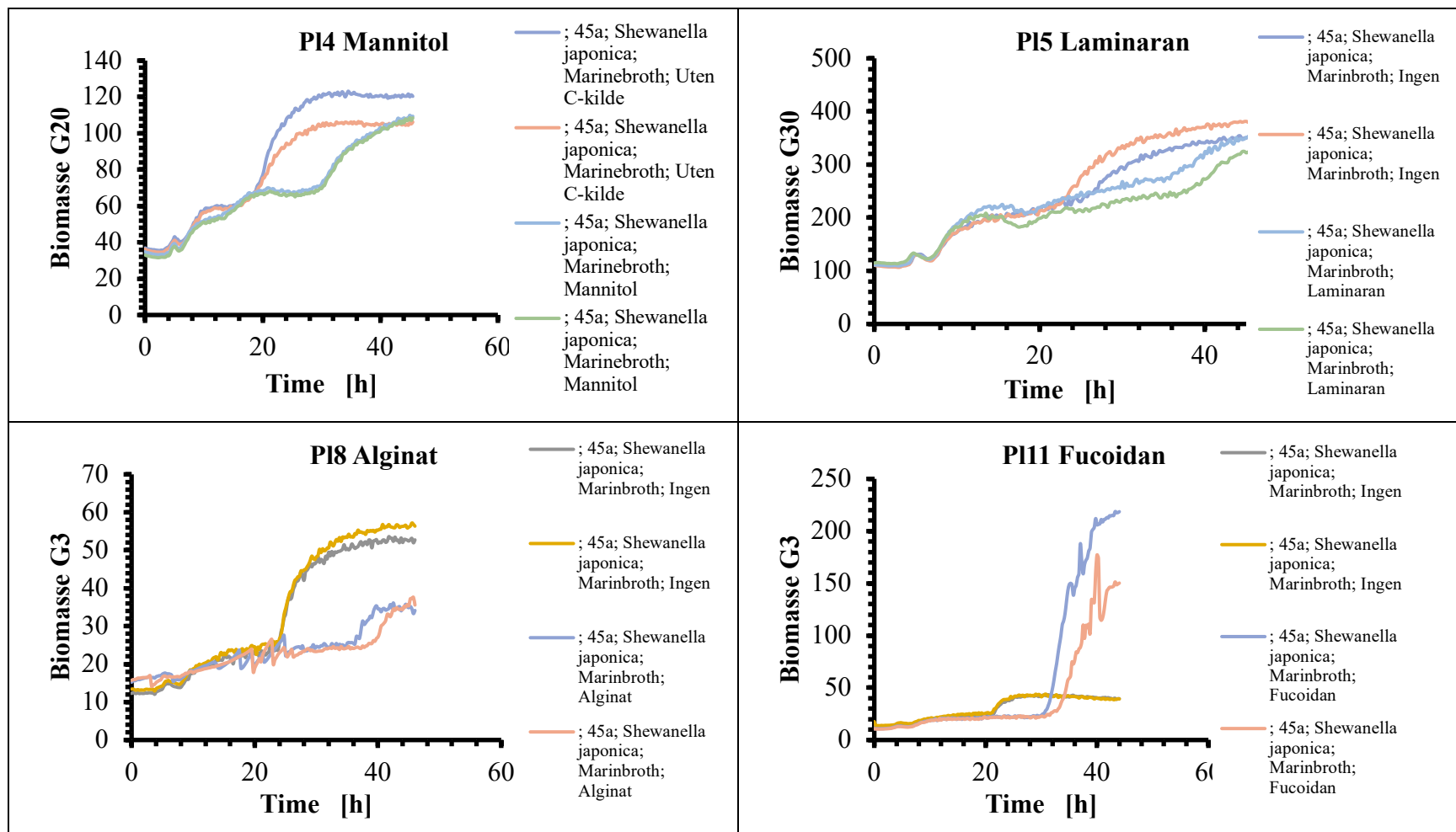
41. *Psychroserpens mesophilus*



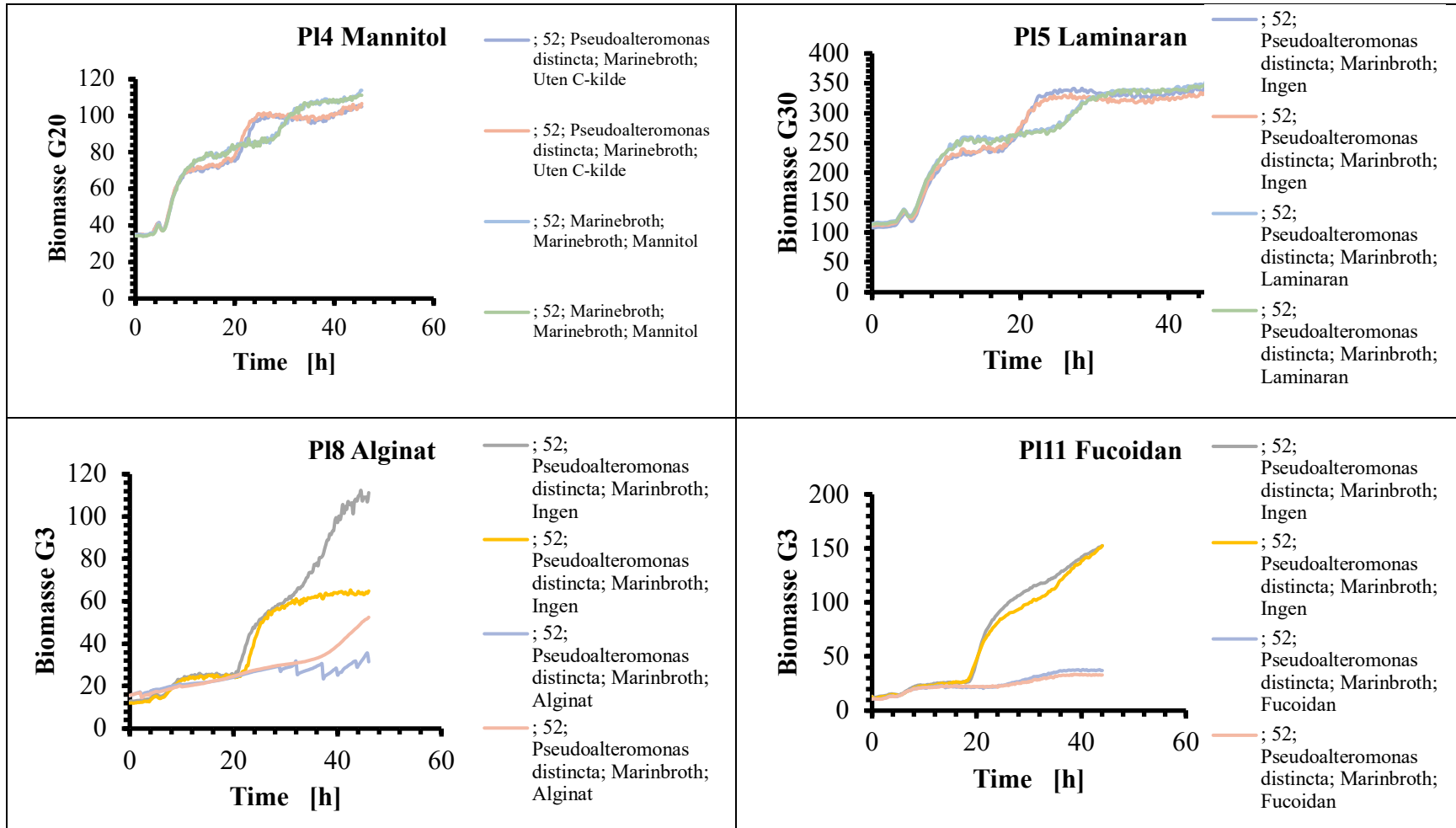
43. *Shewanella baltica*



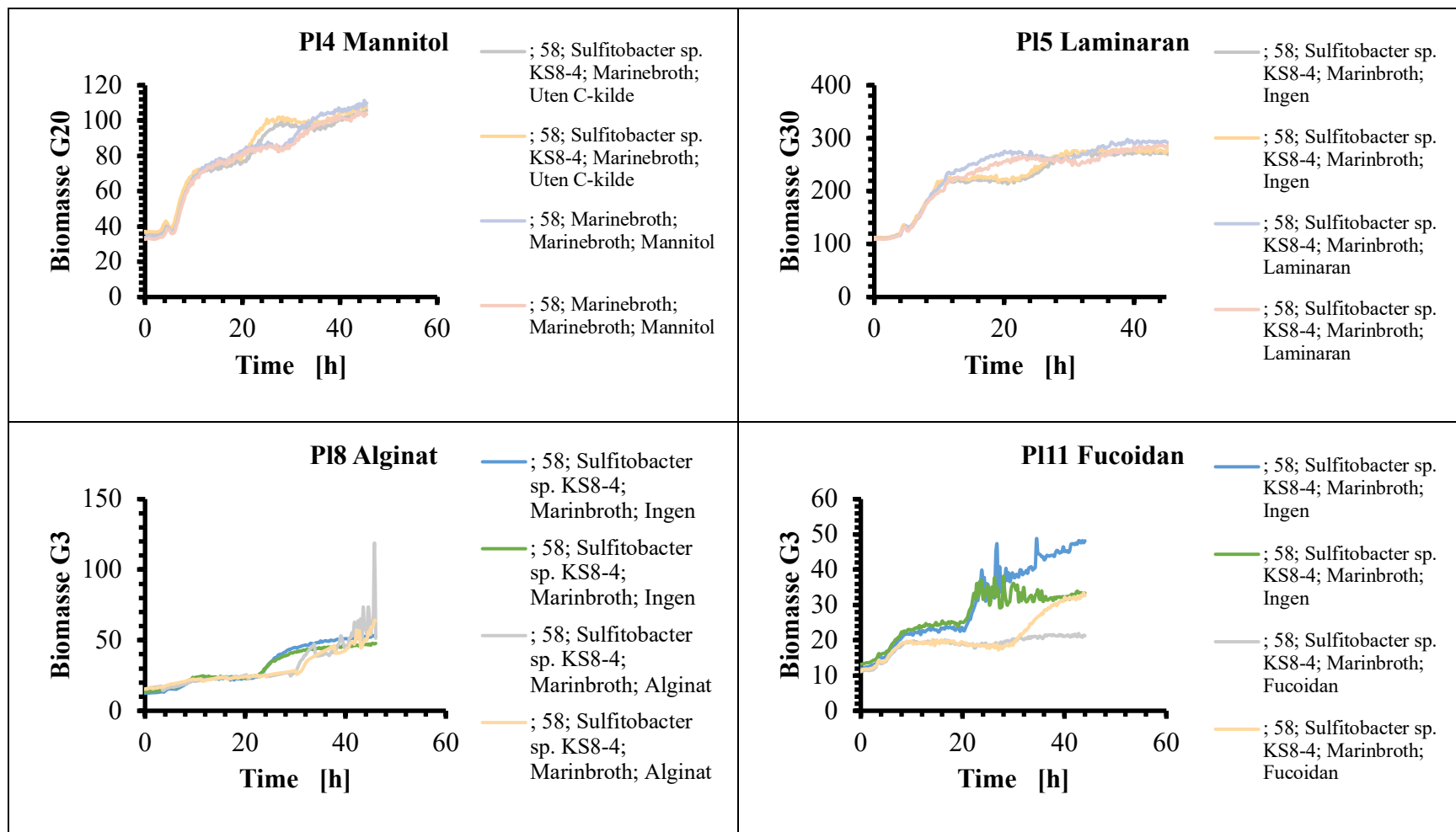
45a. *Shewanella japonica*



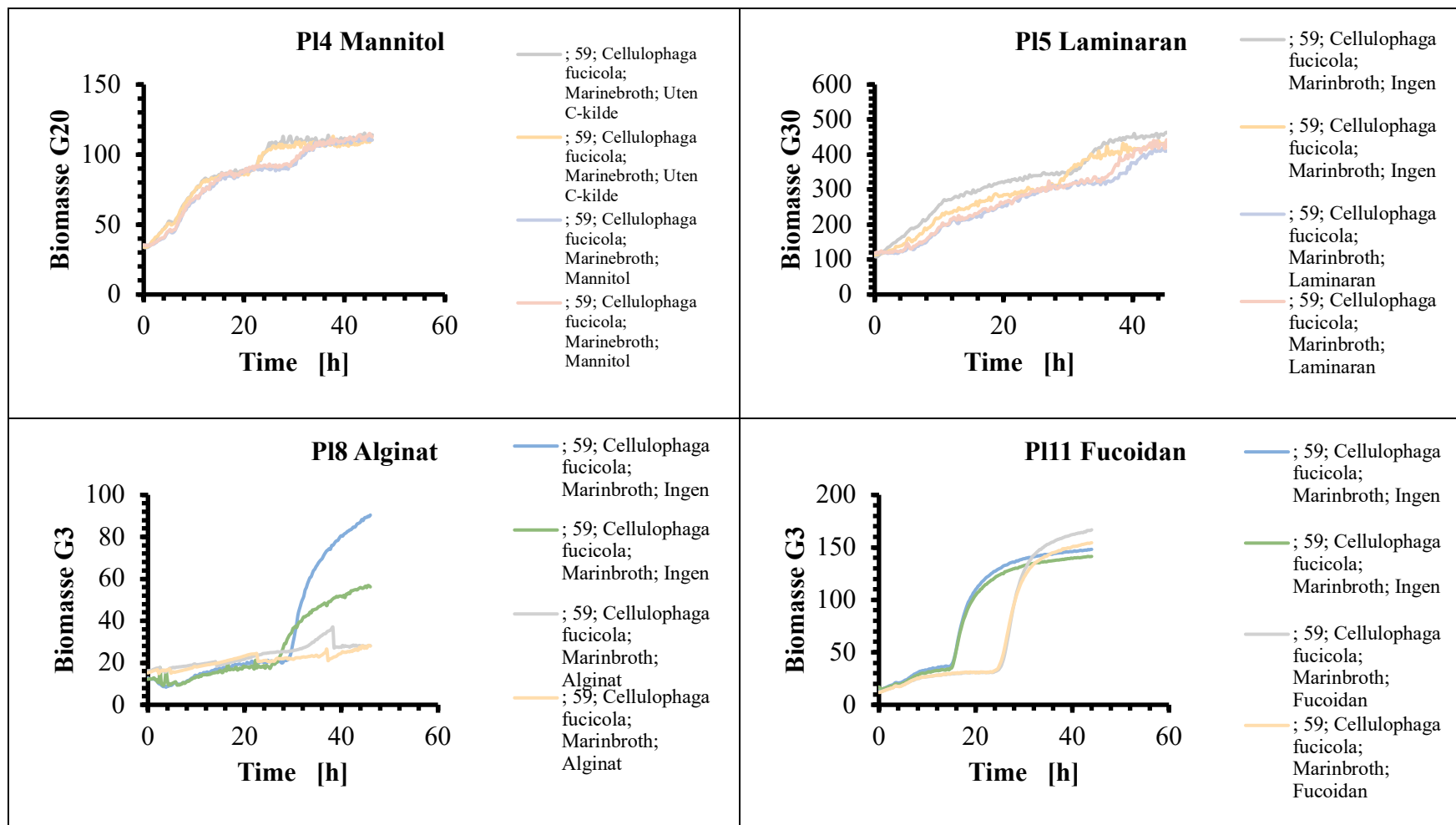
52. *Pseudoalteromonas distincta*



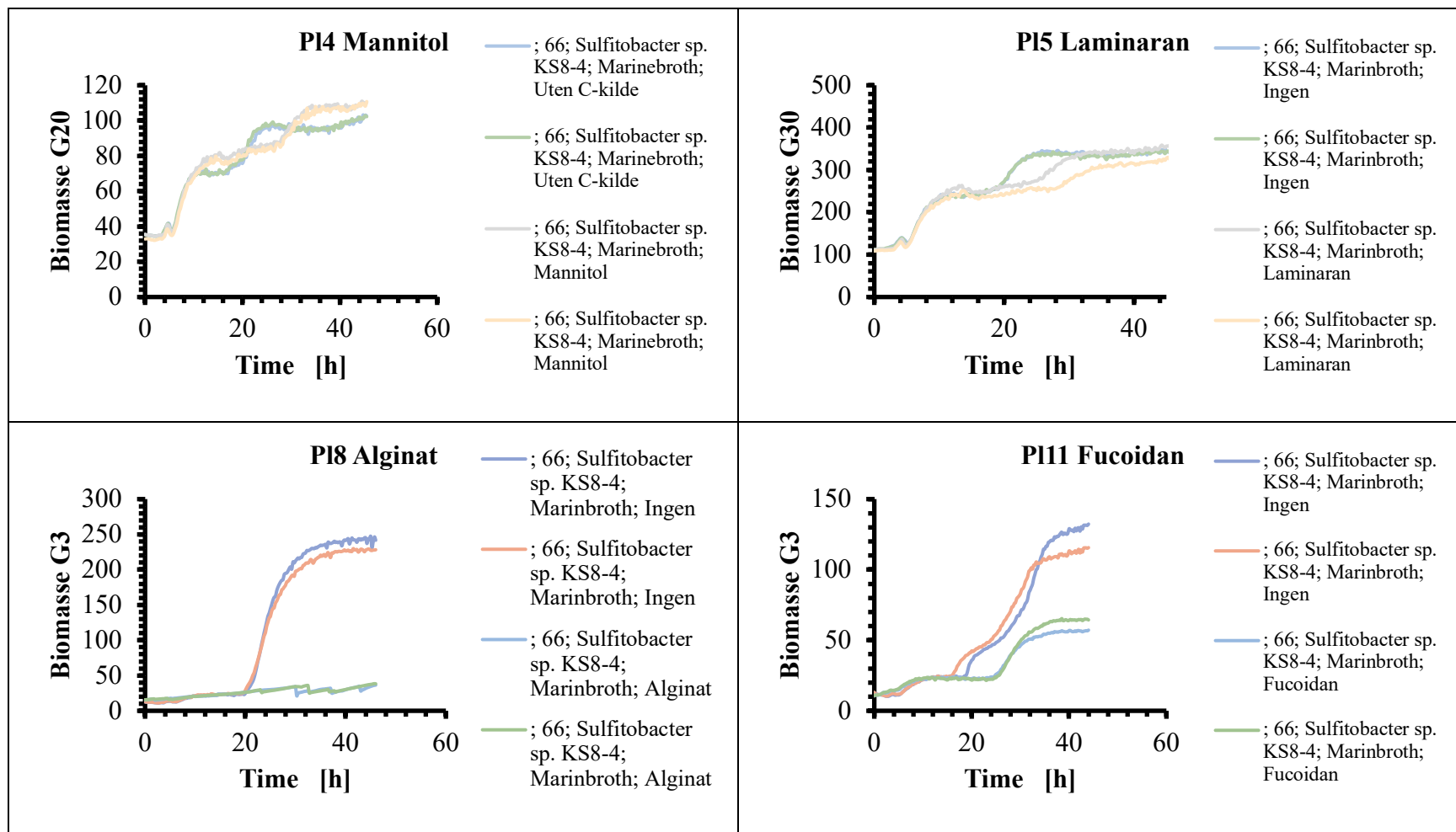
58. *Sulfitobacter* sp. KS8-4



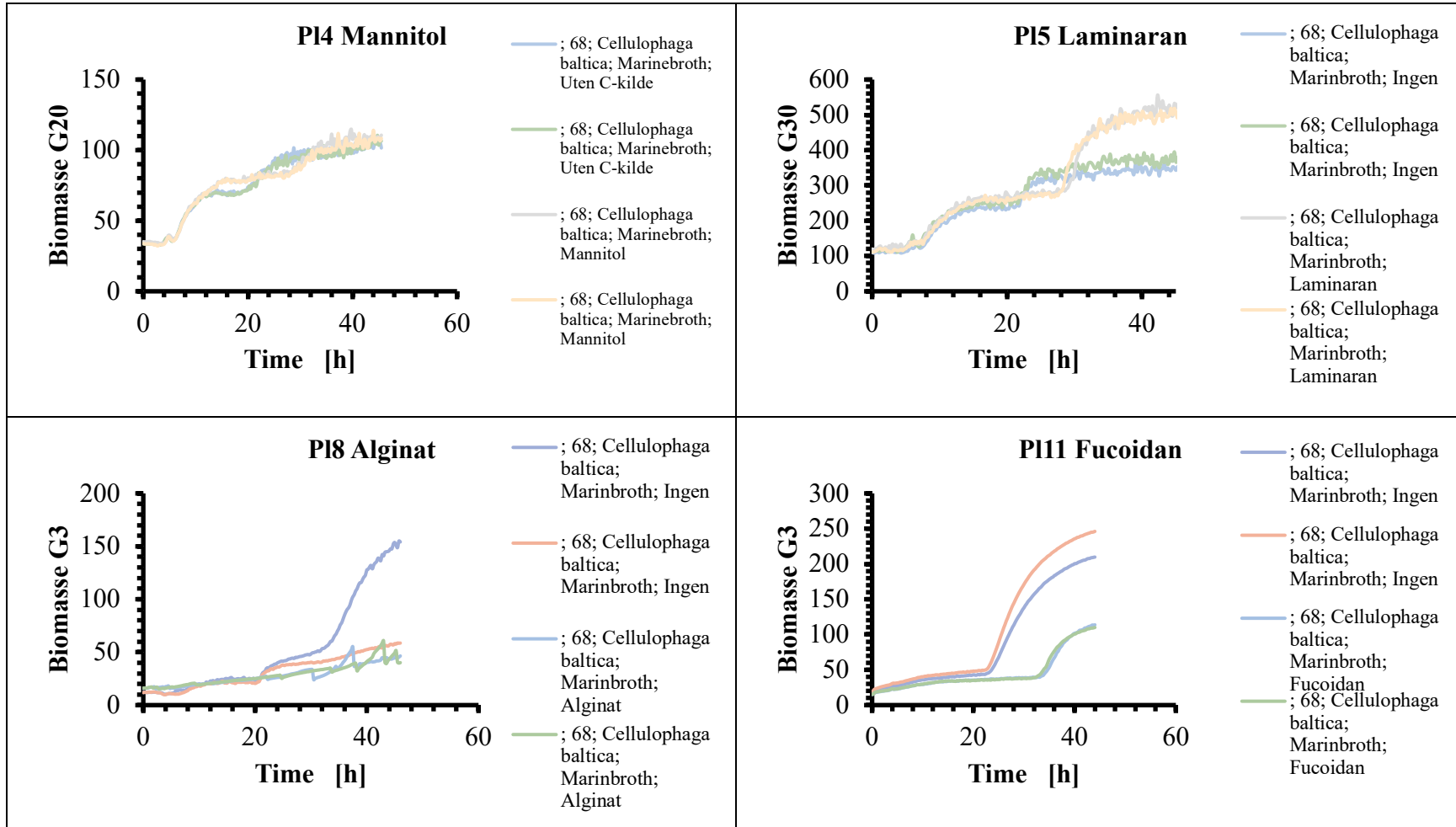
59. *Cellulophaga fucicola*



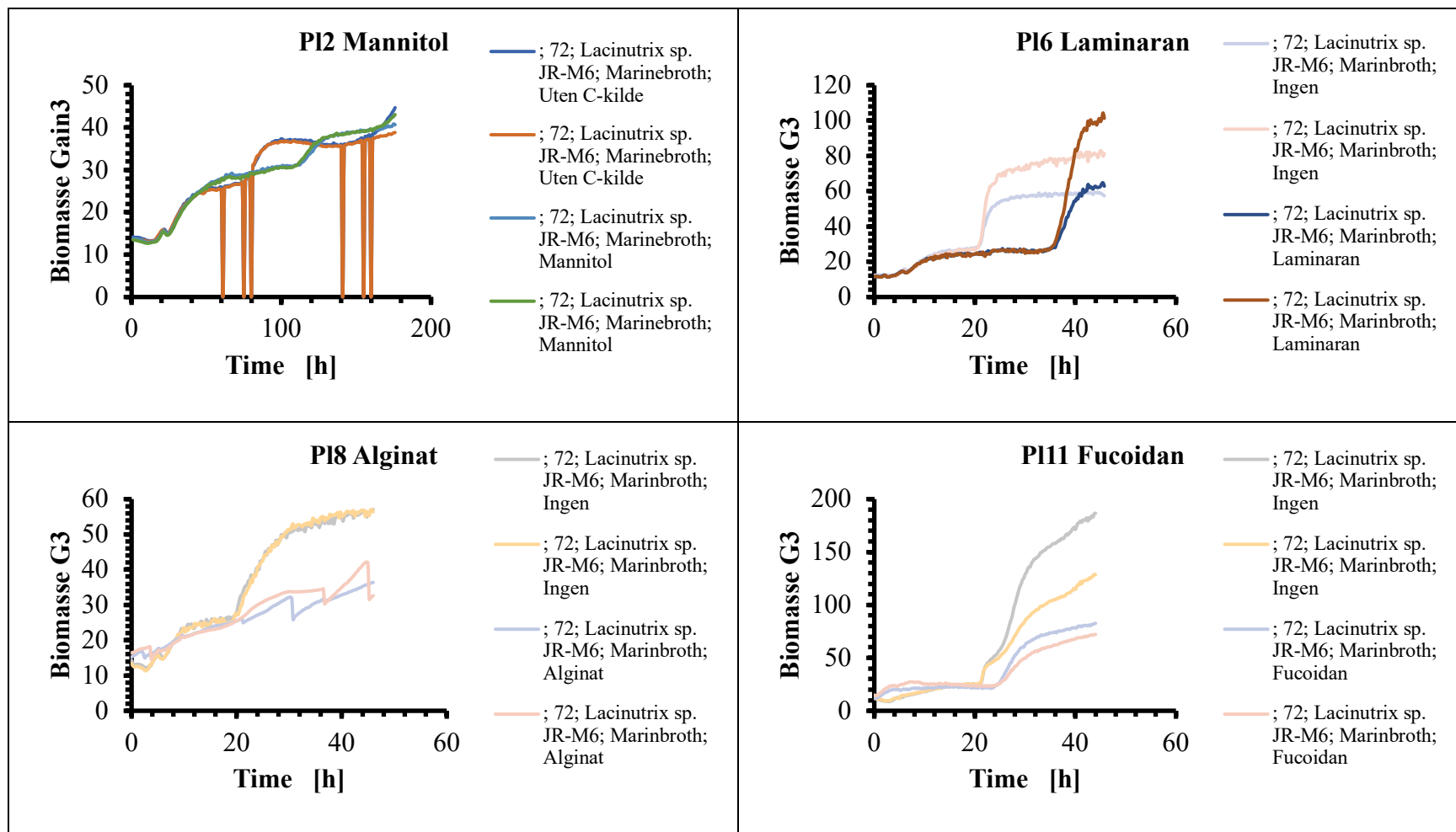
66. *Sulfitobacter* sp. KS8-4



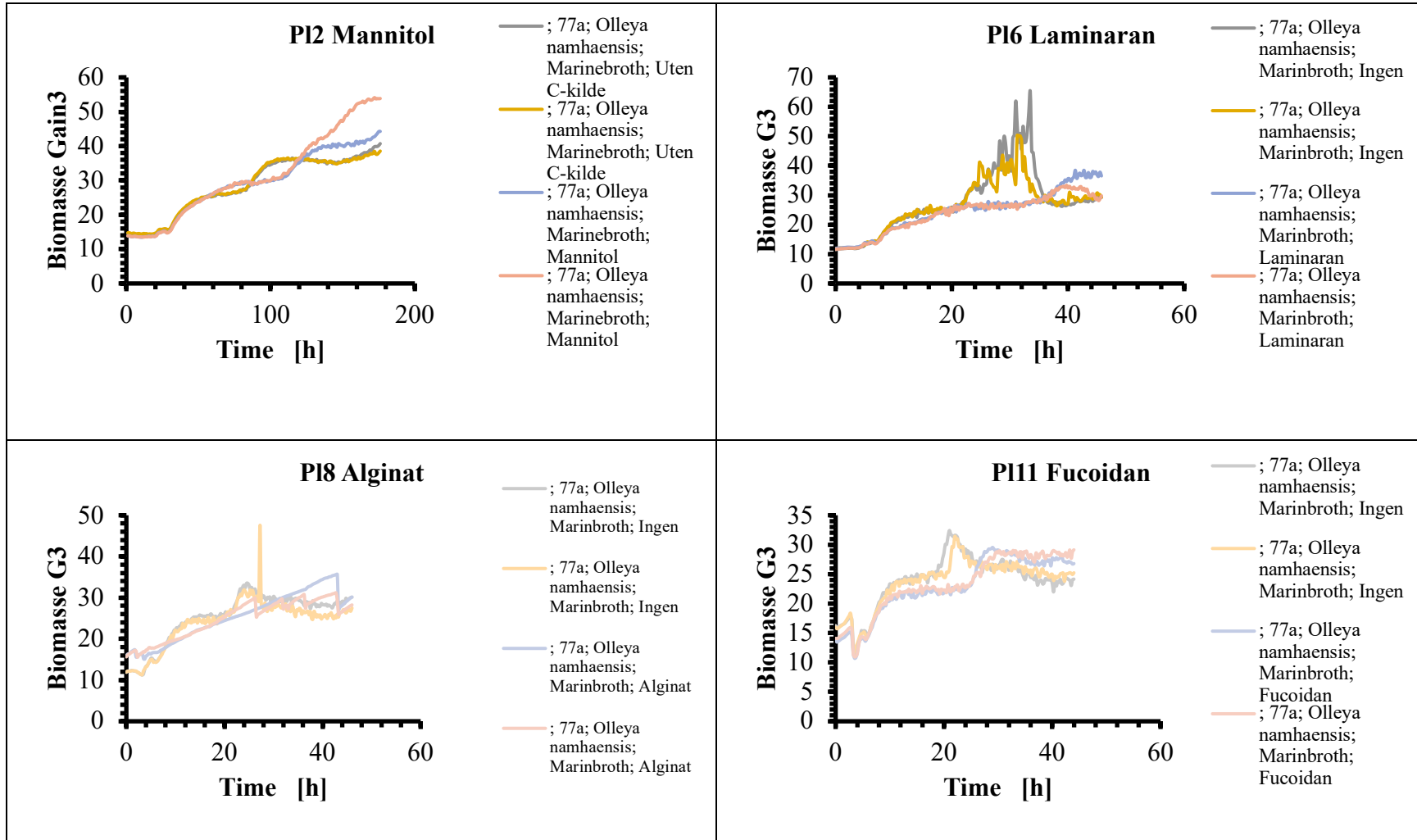
68. *Cellulophaga baltica* (An110)



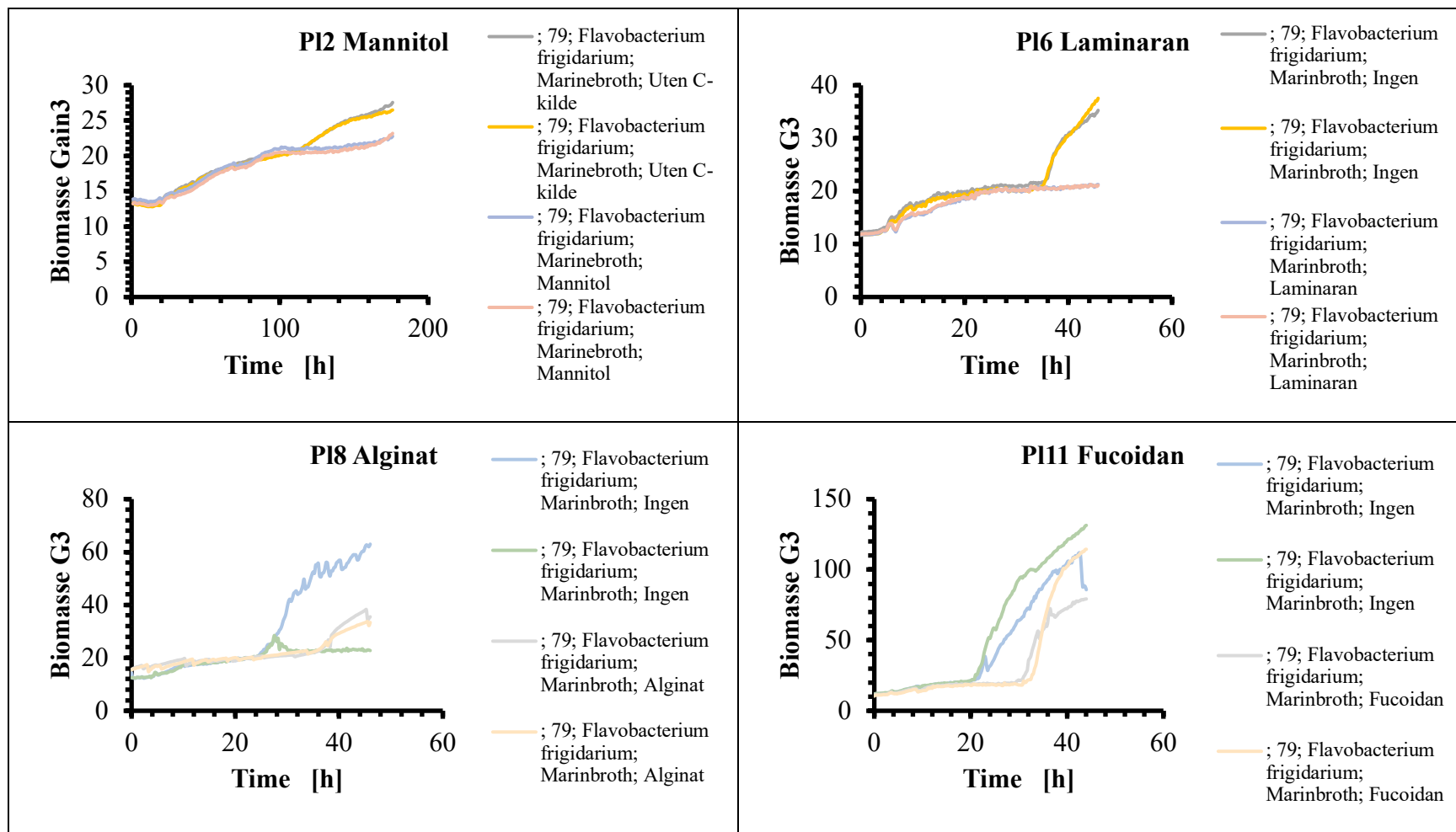
72. *Lacinutrix sp. JR-M6*



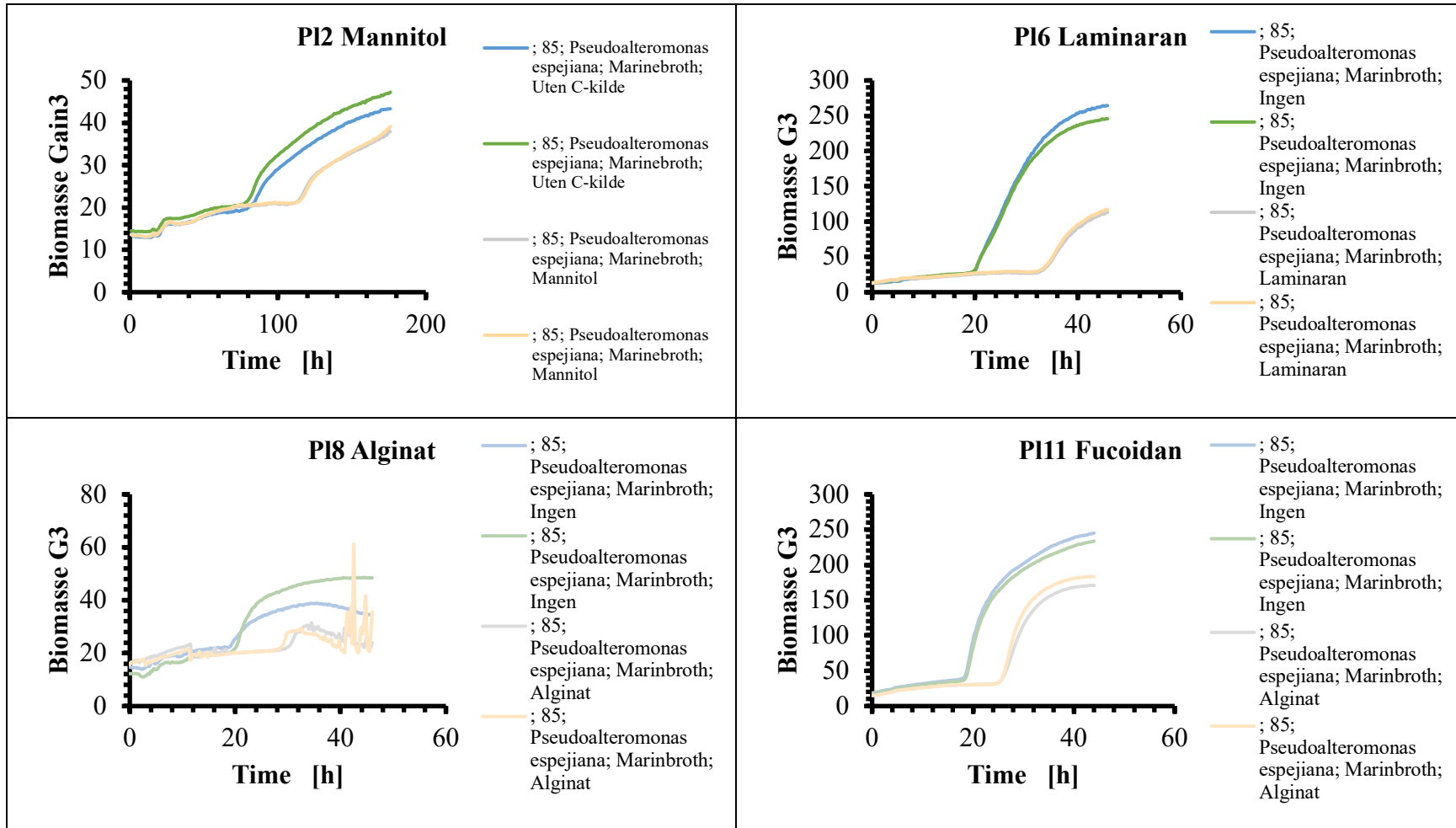
77a. *Olleya namhaensis*



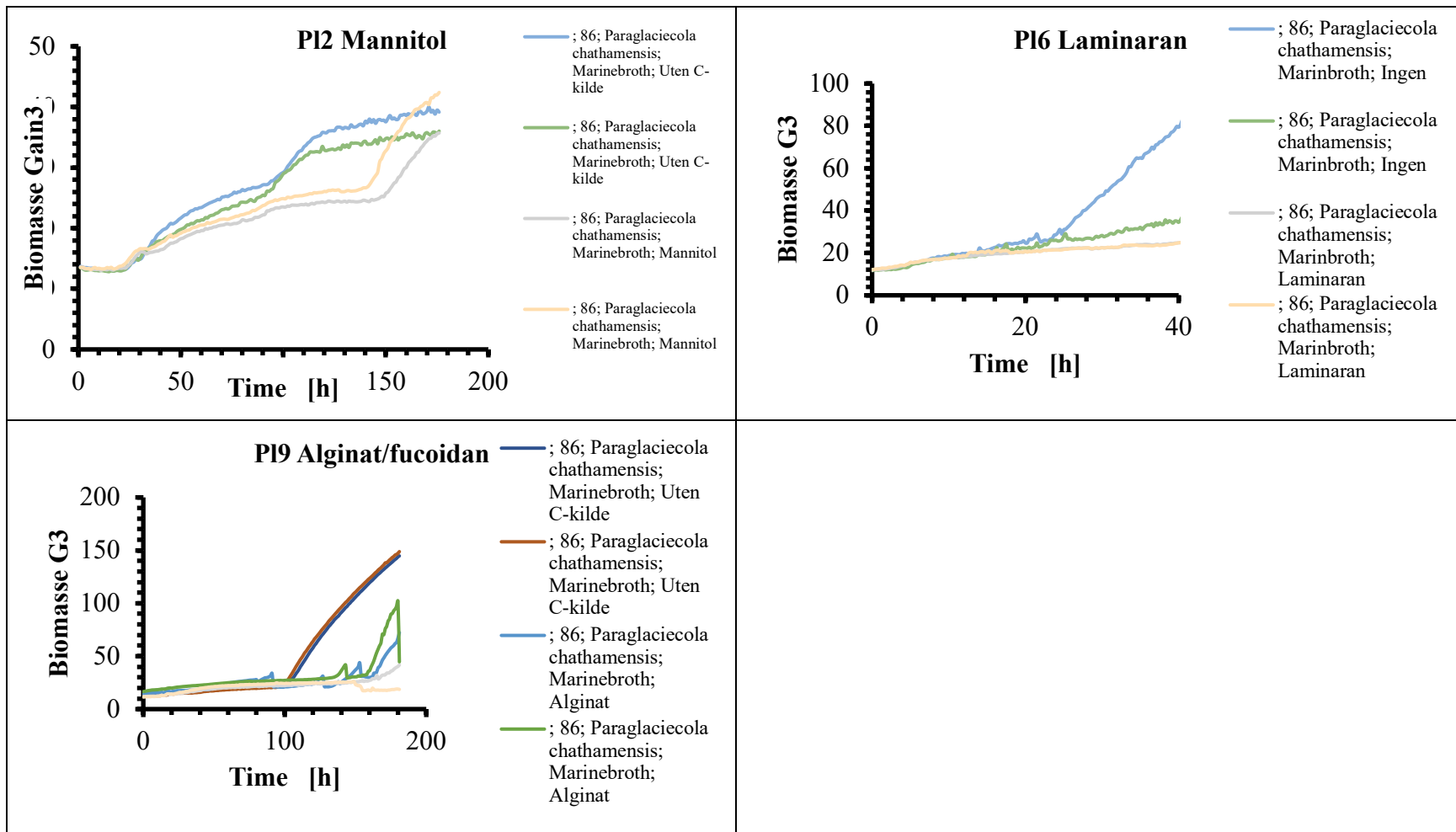
79. *Flavobacterium frigidarium*



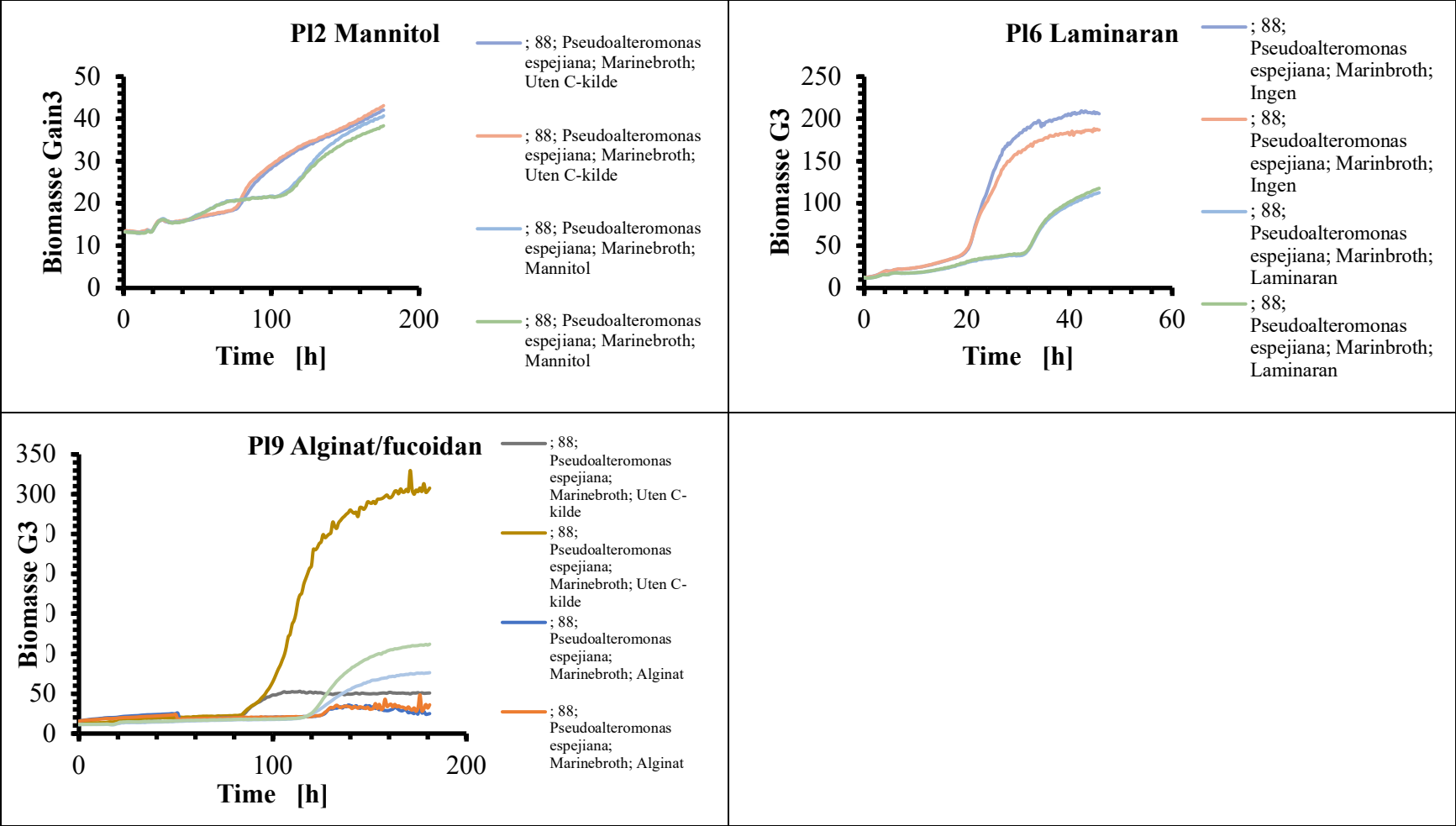
85. *Pseudoalteromonas espejiana*



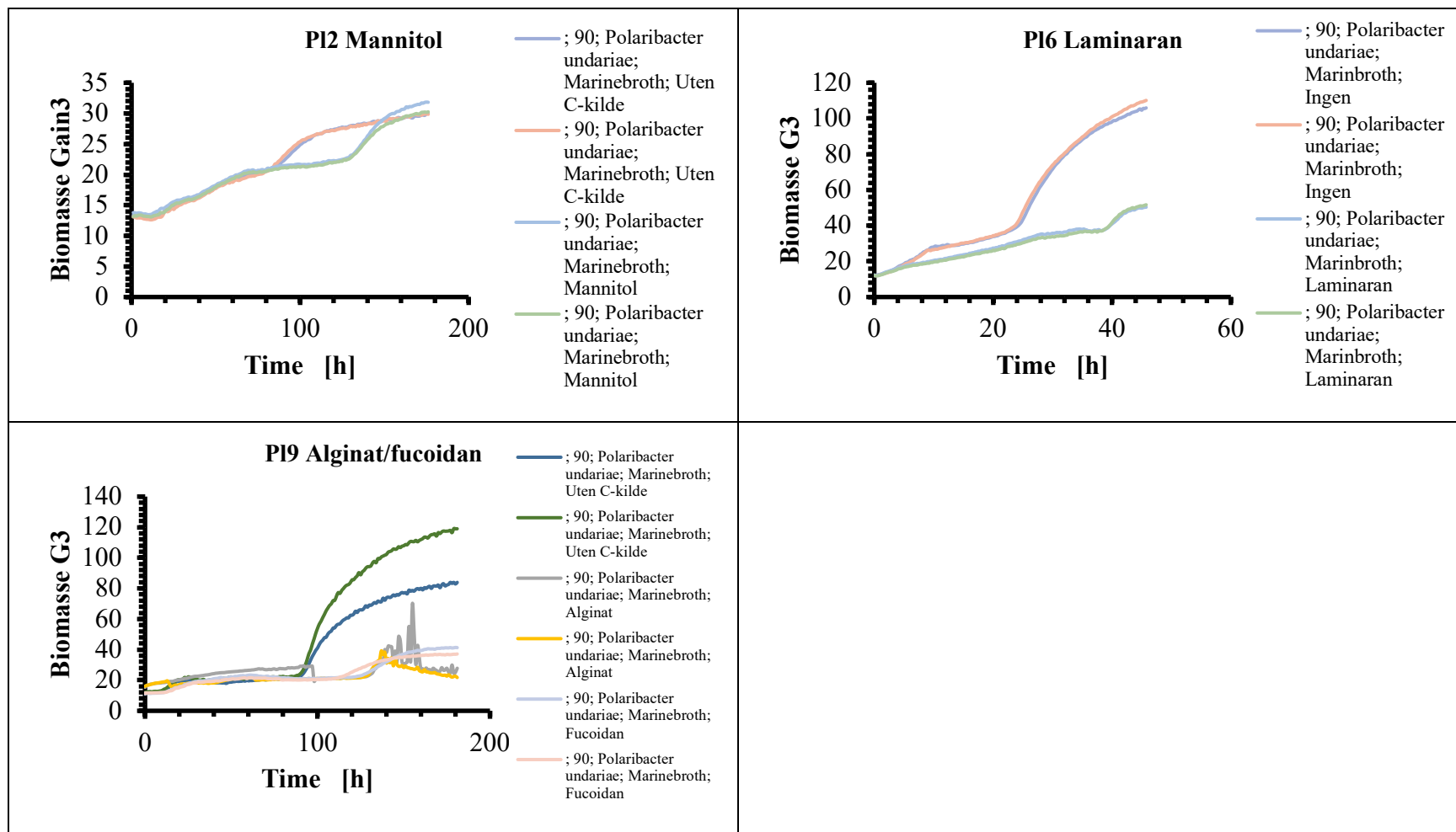
86. *Paraglaciicola chathamensis*



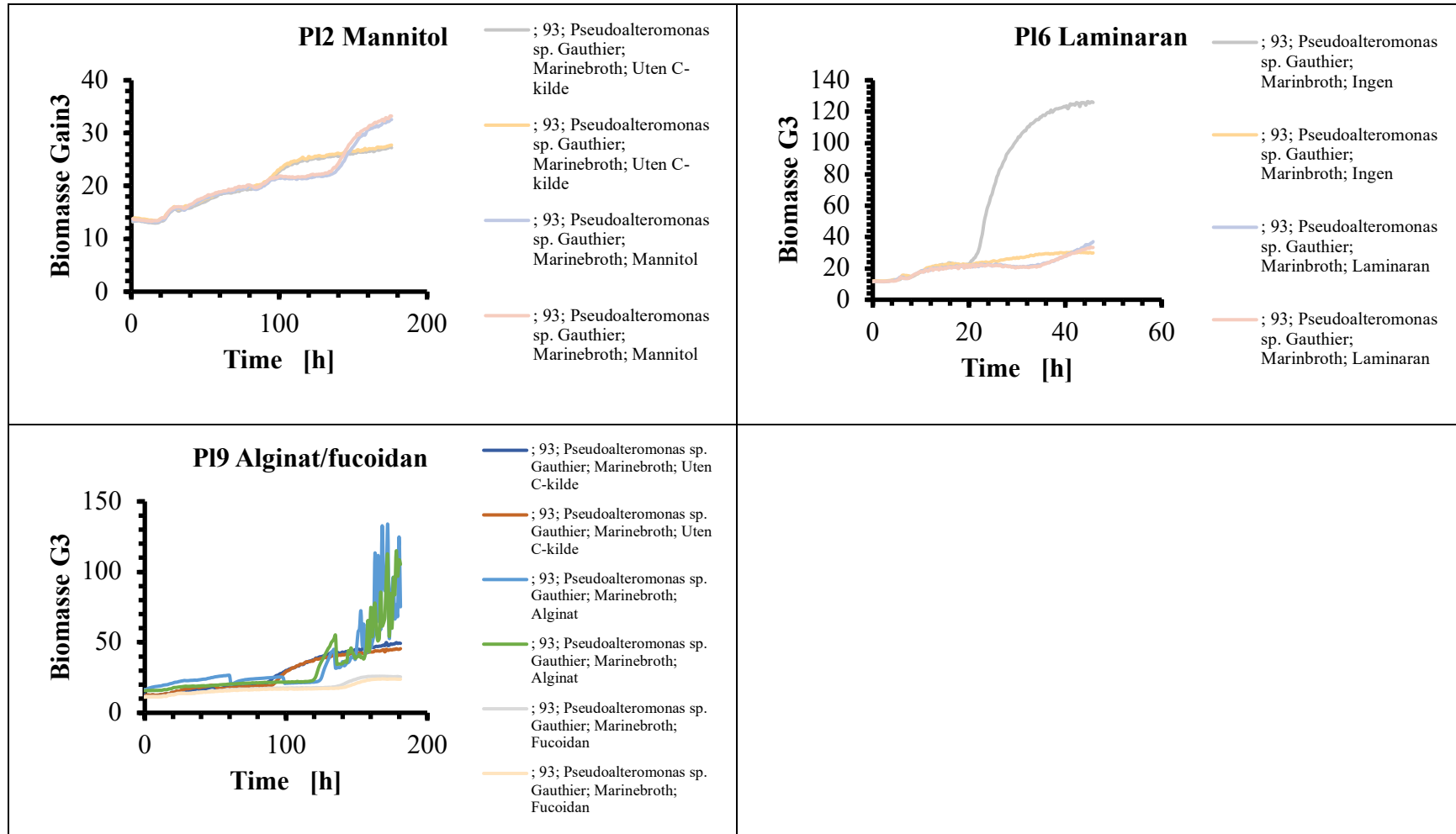
88. *Pseudoalteromonas espejiana*



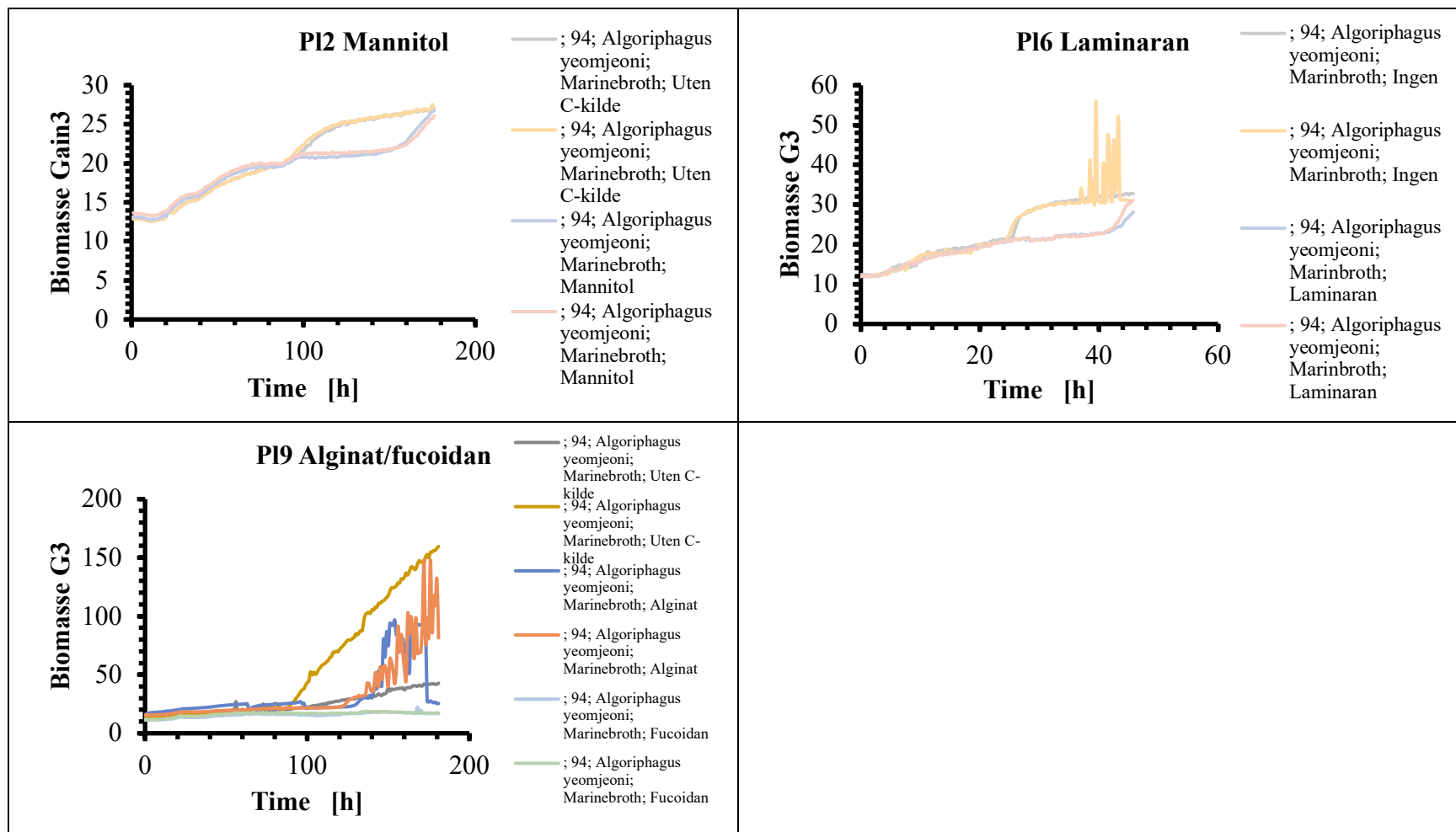
90. *Polaribacter undariae*



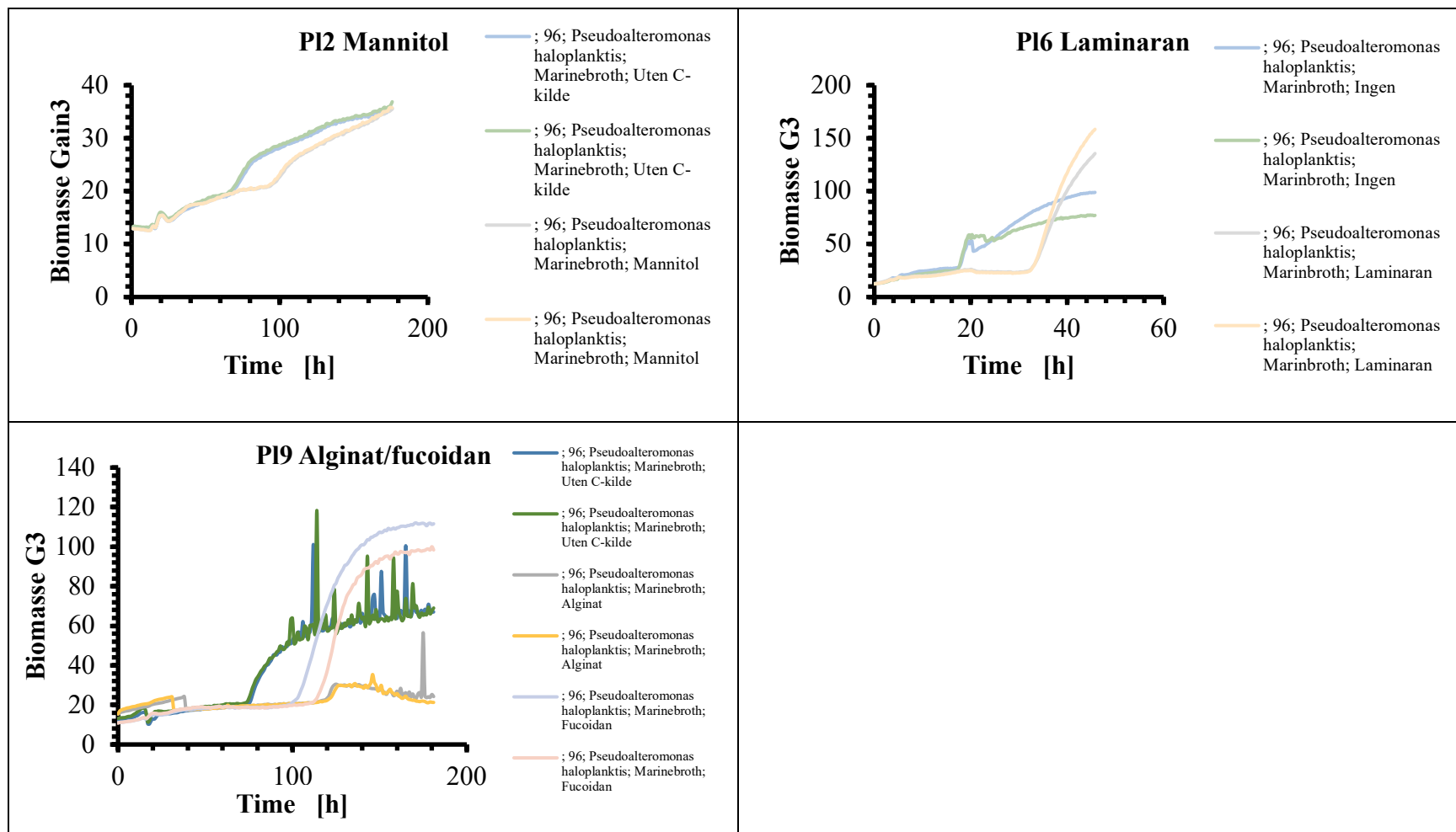
93. *Pseudoalteromonas* sp. Gauthier



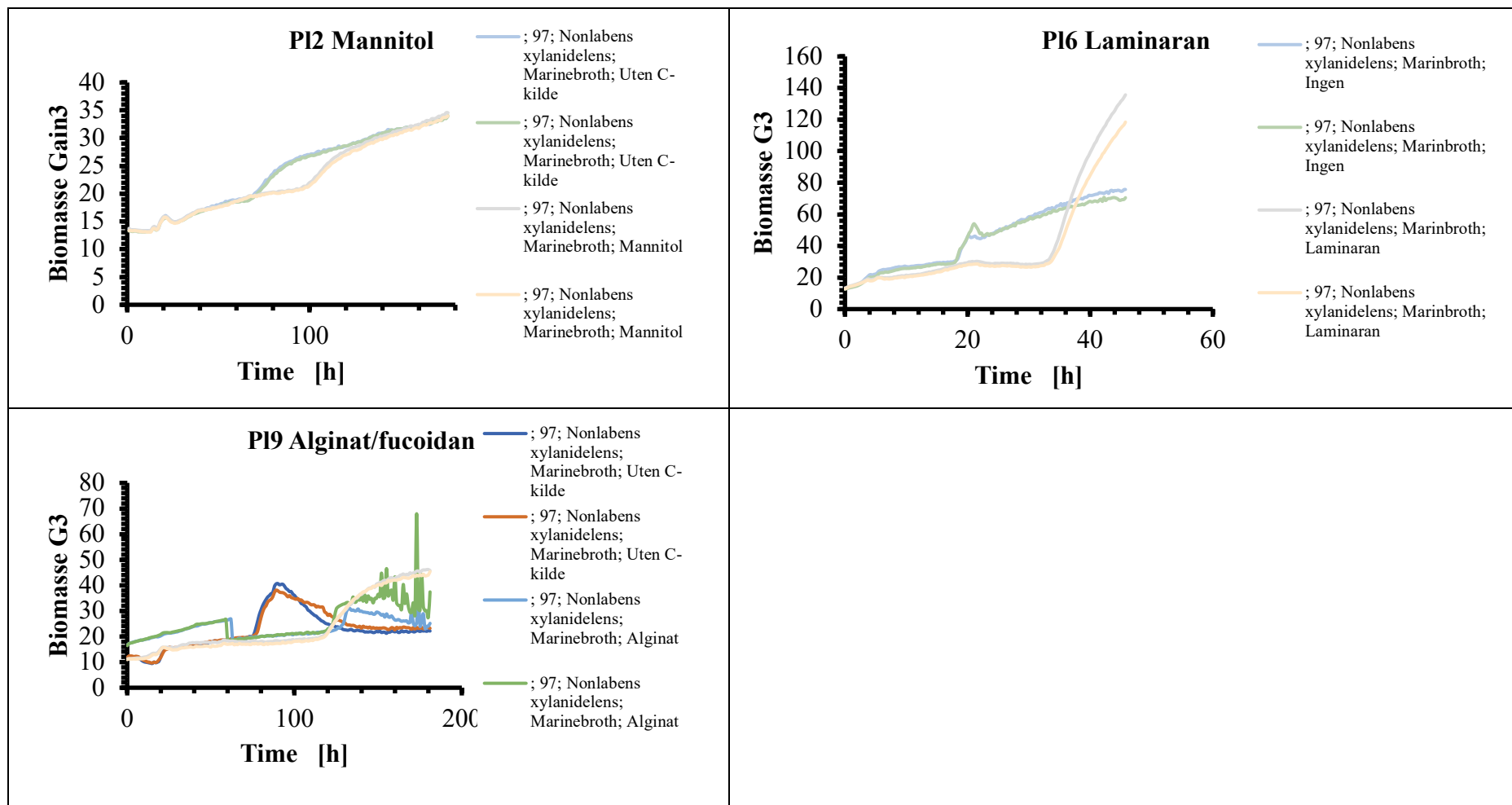
94. *Algoriphagus yeomjeoni*



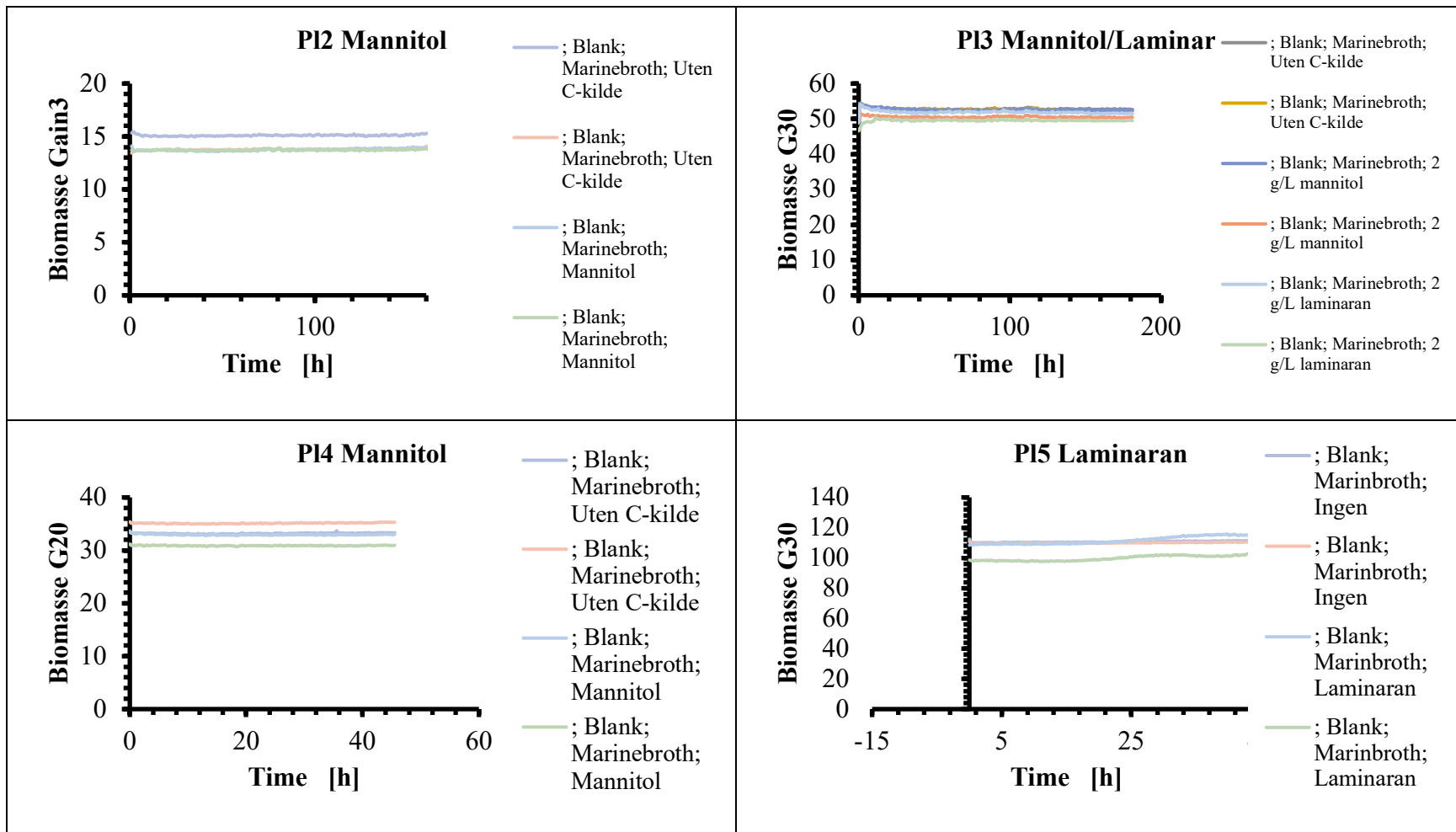
96. *Pseudoalteromonas haloplanktilis*

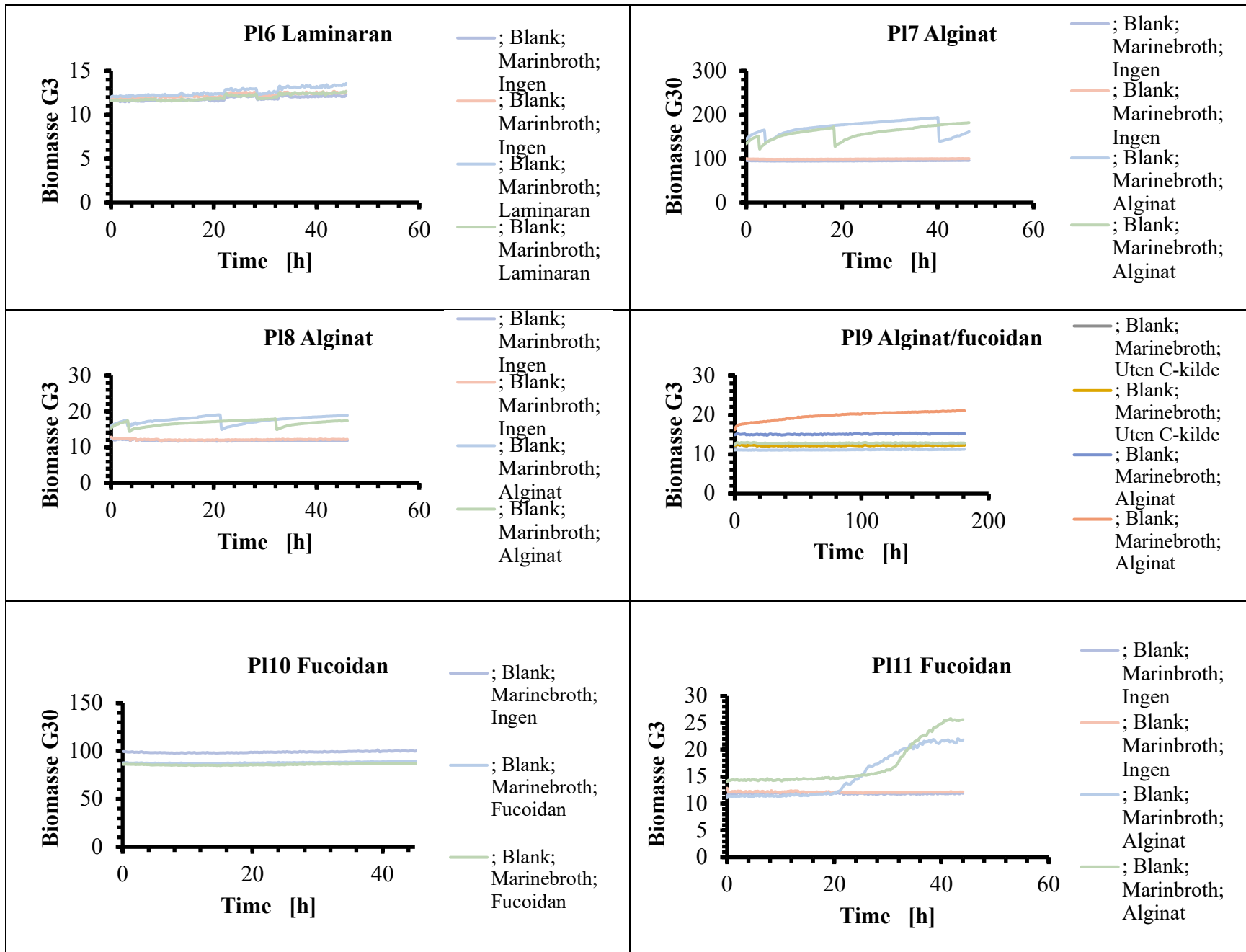


97. *Nonlabens xylanidelens*



Blank





VEDLEGG 7 – MÅLINGER OG OBSERVASJONER FRA KARBONKILDE-SCREENING

Nedenfor presenteres observasjoner og målinger gjort etter karbonkilde-screening. I tabell 8.1 presenteres maksimal oppnådd biomasse for alle de 29 isolatene og tabell 8.2 presenterer slutt-OD av kulturene i platene og observasjoner gjort på aggregatdannelse.

Tabell 7.1 Maksimal registrert biomasse for isolatene i de ulike dyrkingsmediene. Biomasse markert i blått er registrert ved gain 3, biomasse markert grønn er registrert ved gain 20 og biomasse markert i grått er registrert ved gain 30. Isolatene er organisert etter familietilhørighet

Isolat nr.	Art	Biomasse							
		MB	MB+ Mannitol	MB	MB+ Laminaran	MB	MB+ Alginat	MB	MB+ Fucoidan
1	Cellulophaga sp. An110	121,5	191,0	121,5	160,5	244,4	433,3	291,6	411,0
9	Algibacter lectus	119,4	127,9	119,4	142,8	325,4	302,6	735,7	238,4
19	Cellulophaga fucicola	125,1	92,5	125,1	120,1	667,4	275,2	455,1	354,0
22	Algibacter lectus	119,0	105,3	119,0	121,9	1045,1	223,9	1343,5	545,1
23	Cellulophaga sp. An110	111,7	107,9	111,7	109,1	860,7	245,2	848,5	264,0
39	Algibacter miyuki	107,9	92,7	239,3	240,1	1414,7	240,6	1187,8	777,5
41	Psychroserpens mesophilus	79,0	69,5	241,2	488,8	892,5	269,1	491,4	209,3
59	Cellulophaga fucicola	110,3	112,9	453,0	420,0	73,0	31,4	147,6	160,4
68	Cellulophaga baltica	103,5	108,4	520,8	372,2	106,3	40,1	228,0	110,0
72	Lacinutrix sp. JR-M6	41,6	42,2	69,4	82,1	56,4	36,4	157,6	77,4
77a	Olleya namhaensis	39,7	49,1	29,8	32,1	28,9	33,4	26,0	28,4
79	Flavobacterium frigidarium	27,0	23,0	36,2	20,9	28,5	35,8	71,6	96,9
90	Polaribacter undariae	30,2	31,0	196,9	117,0	101,4	24,8	101,4	39,2
97	Nonlabens xylanidelens	34,0	34,0	72,1	125,4	24,0	32,5	24,0	45,4
11	Pseudoalteromonas aliena	156,9	139,1	156,9	148,1	1387,9	343,3	437,1	403,2
27	Pseudoalteromonas sp.	97,0	102,9	337,2	653,2	224,0	317,3	1346,3	420,0
52	Pseudoalteromonas distincta	106,7	111,2	345,5	357,3	85,4	44,2	152,5	35,0
85	Pseudoalteromonas espejiana	45,3	37,7	255,0	116,2	83,8	30,1	239,5	177,2
88	Pseudoalteromonas espejiana	43,0	39,3	196,6	116,0	50,81	31,9	50,81	94,4
93	Pseudoalteromonas sp. Gauthier	27,7	32,8	77,9	33,3	47,4	110,2	47,4	24,7
96	Pseudoalteromonas haloplanktis	36,9	35,8	88,0	147,0	67,5	22,8	67,5	210,0
14	Marinomonas gallaica	125,1	92,5	125,1	120,1	667,4	275,2	865,8	541,2
32	Paraglaciecola mesophila	110,0	97,2	346,8	260,8	980,0	249,6	1429,5	709,1
86	Paraglaciecola chathamensis	37,4	39,0	31,7	26,4	146,5	87,1	146,5	29,2
43	Shewanella baltica	78,8	67,2	266,1	264,8	158,9	30,2	33,0	44,6
45a	Shewanella japonica	113,7	108,5	369,0	343,2	54,5	35,6	39,3	183,8
58	Sulfitobacter sp. KS8-4	109,1	106,7	279,1	287,0	48,5	64,0	40,8	26,9
66	Sulfitobacter sp. KS8-4	102,2	110,8	332,0	346,9	234,8	38,3	124,0	60,8
94	Algoriphagus yeomjeoni	26,8	26,5	31,8	29,0	159,6	95,1	159,6	17,4

Tabell 7.2 Verdier for sluttOD ved 600 nm og observasjoner gjort i brønnene med høyde på aggregatdannelse for alle isolatene i alle dyrkingsmediene benyttet. Isolatene er organisert med høyde på familietilhørighet.

Iso-latnr.	M,,Art	SluttOD (OD600)								Observasjoner på aggregatdannelse							
		MB	MB+ Mannitol	MB	MB+ Laminaran	MB	MB+ Alginat	MB	MB+ Fucoidan	MB	MB+ Mannitol	MB	MB+ Laminaran	MB	MB+ Alginat	MB	MB+ Fucoidan
1	Cellulophaga sp. An110	2,7	8,2	2,7	4,5	5,5	0,7	0,3	1,3	Aggr.		Aggr.					
9	Algibacter lectus	5,8	15,5	5,8	7,0	2,2	6,5	4,6	6,1	Aggr.		Aggr.		Aggr.		Aggr.	
19	Cellulophaga fucicola	2,7	3,7	2,7	9,8	2,2	4,6	2,6	2,8	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.			
22	Algibacter lectus	2,4	1,8	2,4	3,9	1,0	3,4	1,8	6,7	Aggr.		Aggr.				Aggr.	Aggr.
23	Cellulophaga sp. An110	2,8	3,0	2,8	4,2	2,4	5,1	2,4	3,7	Aggr.		Aggr.		Aggr.		Aggr.	
39	Algibacter miyuki	8,9	23,1	7,0	13,2	4,0	2,2	4,0	4,0								
41	Psychroserpens mesophilus	3,9	5,5	2,3	5,5	4,1	5,8	4,1	8,3					Aggr.		Aggr.	Aggr.
59	Cellulophaga fucicola	3,6	5,8	12,6	9,0	14,1	9,7	4,5	0,3	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.			
68	Cellulophaga baltica	2,3	7,5	2,1	17,3	10,4	4,1	3,0	-0,7	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.			
72	Lacinutrix sp. JR-M6	1,2	10,0	3,6	2,6	3,3	2,0	2,9	3,3								
77a	Olleya namhaensis	3,6	23,4	3,5	2,5	3,3	2,5	4,2	5,3	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
79	Flavobacterium frigidarium	1,4	2,2	10,0	0,6	7,4	2,6	22,5	3,4			Aggr.		Aggr.		Aggr.	Aggr.
90	Polaribacter undariae	3,7	16,4	3,0	3,5	3,1	2,4	3,1	3,6	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.
97	Nonlabens xylanidelens	4,6	13,6	3,6	18,4	3,3	2,8	3,3	4,4	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.
11	Pseudoalteromonas aliena	5,0	5,7	5,0	3,2	3,4	3,2	2,3	1,4								Aggr.
27	Pseudoalteromonas sp.	8,4	23,9	13,1	14,7	6,5	5,2	24,3	9,7	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.
52	Pseudoalteromonas distincta	2,4	5,8	4,3	8,8	2,5	3,3	3,4	0,2	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
85	Pseudoalteromonas espejiana	10,0	15,0	0,6	7,1	3,8	2,8	7,8	4,4	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
88	Pseudoalteromonas espejiana	11,7	17,8	7,9	8,9	3,9	2,8	3,9	5,7	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
93	Pseudoalteromonas sp. Gauthier	8,0	13,5	8,1	6,0	4,3	5,1	4,3	3,7	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.
96	Pseudoalteromonas haloplanktis	7,9	13,7	4,8	6,7	4,7	2,5	4,7	5,4	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.
14	Marinomonas gallaica	9,0	9,8	9,0	14,7	5,7	4,3	2,1	0,3	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
32	Paraglaciecola mesophila	1,2	11,8	1,7	12,2	2,3	4,3	0,7	13,0	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
86	Paraglaciecola chathamensis	1,2	2,5	1,4	2,8	1,4	5,2	1,4	2,4	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.
43	Shewanella baltica	4,1	13,0	2,0	6,8	3,1	3,8	3,1	0,0	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
45a	Shewanella japonica	5,0	9,8	8,1	19,8	3,4	2,2	6,8	-0,2					Aggr.			
58	Sulfitobacter sp. KS8-4	4,3	6,0	2,5	5,0	4,6	3,3	3,3	0,4	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
66	Sulfitobacter sp. KS8-4	4,0	7,6	4,0	3,3	5,9	2,4	2,0	-0,1			Aggr.	Aggr.	Aggr.		Aggr.	Aggr.
94	Algoriphagus yeomjeoni	4,5	19,3	3,3	6,0	3,3	4,4	3,3	2,2			Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.	Aggr.

VEDLEGG 8 – PROTOKOLLER

MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit [55]

Manual

MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit

1. Introduction

The MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit provides all of the reagents needed to purify DNA from Gram-positive and Gram-negative bacteria. Gram-positive bacteria lyse more readily after treatment with Ready-Lyse™ Lysozyme and the Gram Positive Cell Lysis Solution. Ready-Lyse Lysozyme is a stable solution of a non-mammalian, non-avian recombinant lysozyme, with high specific activity and no net charge at neutral pH. Thus, there is no waiting to dissolve the lysozyme and it does not bind DNA.

2. Product designations and kit components

Product	Kit size	Catalog number	Reagent description	Part number	Volume
MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit	100 purifications	MGP04100	Ready-Lyse Lysozyme Solution (~ 30,000 U/μL)	E0057-D1	100 μL
			TE Buffer	SS000001-D3	20 mL
			Proteinase K (50 μg/μL)	SS000099-D2	100 μL
			RNase A (5 μg/μL)	SS000213-D2	100 μL
			MPC Protein Precipitation Reagent	SS000399-D2	20 mL
			MasterPure Gram Positive Cell Lysis Solution (2X)	SS000402-D4	15 mL

3. Product specifications

Storage: Store the Proteinase K, Ready-Lyse Lysozyme and RNase A at -20 °C in a freezer without a defrost cycle. Store the remainder of the kit at room temperature for ease of use.

Storage buffers: RNase A is supplied in a 50% glycerol solution containing 25 mM ammonium acetate (pH 4.6); Ready-Lyse Lysozyme is supplied in a 50% glycerol solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol (DTT) and 0.1% Triton® X-100 (Rohm & Haas); Proteinase K is supplied in a 50% glycerol solution containing 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM CaCl₂, 0.1% Triton X-100 and 1 mM DTT.

Quality control: The MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit is function-tested by purifying DNA from *Bacillus subtilis*. DNA quality and yield are assayed by agarose gel electrophoresis, spectrophotometry and use as a template for PCR.

4. Gram positive DNA purification protocol

1. Pellet by centrifugation, 1.0 mL of an overnight Gram-positive bacterial culture. Discard the supernatant.
2. Add 150 μL of TE Buffer and vortex to resuspend the cell pellet.
3. Add 1 μL of Ready-Lyse Lysozyme to each resuspended pellet (from 1.0 mL culture) of bacteria.
4. Incubate at 37 °C for 30 minutes to overnight. See examples in Table 1.

Manual

MasterPure Gram Positive DNA Purification Kit

5. Dilute 1 μL of Proteinase K (50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) into 150 μL of Gram Positive Lysis Solution for each 1.0 mL of culture pellet.
6. Add 150 μL of the Proteinase K/Gram Positive Lysis Solution to the sample and mix thoroughly.
7. Incubate at 65-70 $^{\circ}\text{C}$ for 15 minutes, vortexing briefly every 5 minutes.
8. Cool the samples to 37 $^{\circ}\text{C}$.
9. Place the samples on ice for 3-5 minutes and then proceed with DNA Precipitation.

Bacterial species	Culture medium	Ready-Lyse incubation time	DNA yield $\mu\text{g}/\text{mL}$
<i>Bacillus subtilis</i>	Brain-heart infusion (BHI)	30 minutes	9.0
<i>Listeria monocytogenes</i>	BHI	Overnight	3.3
<i>Staphylococcus aureus</i>	BHI	Not needed	8.0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	BHI	Not needed	4.3
<i>Streptococcus mutans</i>	Todd-Hewitt	Overnight	3.0

*Addition of mutanolysin or streptolysin (not included) can shorten the time to ~30 minutes

Table 1. Examples of DNA yields from gram positive bacterial species.

DNA precipitation

1. Add 175 μL of MPC Protein Precipitation Reagent to 300 μL of lysed sample and vortex mix vigorously for 10 seconds.
2. Pellet the debris by centrifugation at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes at $>10,000 \times g$ in a microcentrifuge.
3. Transfer the supernatant to a clean microcentrifuge tube and discard the pellet.
4. Add 1 μL of RNase A (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) to each sample and mix thoroughly.
5. Incubate at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 30 minutes.
6. Add 500 μL of isopropanol to the recovered supernatant. Invert the tube 30-40 times.
7. Pellet the DNA by centrifugation at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 10 minutes at $>10,000 \times g$ in a microcentrifuge.
8. Use a pipette tip to remove the isopropanol without dislodging the DNA pellet.
9. Rinse the pellet with 70% ethanol. Centrifuge briefly if the pellet is dislodged.
10. Resuspend the DNA in 35 μL of TE Buffer.

5. Further support

If you require any further support, please do not hesitate to contact our Technical Support Team: techsupport@lgcgroup.com.

Expand High Fidelity PCR System [70]

2. How to Use this Product

2.1 Before you Begin

General considerations

The optimal conditions (incubation times and temperatures, concentrations of enzyme, template DNA, Mg²⁺) depend on the system used and have to be determined individually. In particular, the Mg²⁺ concentration and the amount of Expand enzyme mix used per assay should be titrated for optimal efficiency of DNA synthesis.

As a starting point for developing your assays, use the following guidelines:

- Optimal enzyme concentration: 0.5 – 5 U/50 µL. The recommended starting concentration is 2.6 U (0.75 µL).
- Optimal Mg²⁺ concentration can vary from 1.5 – 4 mM. The recommended starting concentration is 1.5 mM when using 200 µM dNTP (each).
- dNTP concentration: always use balanced solutions of all four dNTP. The final concentration of each dNTP should be between 50 and 500 µM; the most commonly used concentration is 200 µM. Increase concentrations of Mg²⁺ when increasing the concentration of dNTP.
- The optimal buffer for the template DNA is either simply PCR grade water or 5 – 10 mM Tris (pH 7 – 8). Avoid dissolving the template in TE buffer because EDTA chelates Mg²⁺.
- Usually it is not necessary to add additives. Nevertheless in some cases improvements can be achieved by using up to 100 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 0.1% Tween 20 (v/v) or 1 – 2% DMSO.

Sample Material

Template DNA, e.g., human genomic DNA*

▲ The quality of the template has a tremendous effect on the success of the PCR.

2.2 Preparation of the Reaction Mixes

For a larger number of reactions, we recommend that you prepare two reaction mixes. This circumvents the need of "Hot Start" and avoids that the 3'–5' exonuclease activity of the proofreading polymerase partially degrades primers and template during the reaction set-up.

It is also recommended to prepare a Master Mix for setting up multiple reactions. The Master Mix typically contains all of the components needed for all PCR tests to be performed at a volume 10% greater than that required for the total number of PCR assays.

1 Briefly vortex and centrifuge all reagents before starting.

2 • Prepare two mixes in a sterile microfuge tubes (on ice):

• **Mix 1** (for one reaction):

Reagent	Volume	Final conc.
sterile double-dist. water	add up to 25 µL	
Deoxynucleotide mix, 10 mM of each dNTP	1 µL	200 µM of each dNTP
Upstream primer	variable	300 nM
Downstream primer	variable	300 nM
Template DNA	variable	0.1 – 250 ng ^a
Final volume	25 µL	

• **Mix 2** (for one reaction):

Reagent	Volume	Final conc.
sterile double-dist. water	19.25 µL	
Expand High Fidelity buffer, 10× conc. with 15 mM MgCl ₂	5 µL	1× (1.5 mM MgCl ₂)
Expand High Fidelity enzyme mix	0.75 µL	2.6 U/reaction
Final volume	25 µL	

Ⓢ When titrating the Mg²⁺ concentration use the Expand High Fidelity buffer, 10× conc. without MgCl₂ and the MgCl₂ stock solution (25 mM).

- 3 • Combine Mix 1 and Mix 2 in a thin-walled PCR tube (on ice).
• Gently vortex the mixture to produce a homogeneous reaction, then centrifuge briefly to collect sample at the bottom of the tube.
Ⓢ Overlay the reaction carefully with mineral oil if required by your type of thermal cycler.

^a e.g., human genomic DNA template: 10 ng – 250 ng; plasmid DNA template: 0.1 ng – 15 ng.

2.3 Thermal Cycling

Place samples in the thermal block cycler, and start cycling using the thermal profile below. The gradually increasing extension time ensures a higher yield of amplification products.

Ⓢ The elongation step should be performed at **+68°C** when PCR products longer than 3 kb are amplified.

	Temperature	Time	Cycles
Initial Denaturation	94°C	2 min	1×
Denaturation	94°C	15 s	10×
Annealing	45 – 65°C ^b	30 s	
Elongation	68 or 72°C ^c	45 s – 8 min ^d	
Denaturation	94°C	15 s	15 – 20×
Annealing	45 – 68°C ^b	30 s	
Elongation	72°C ^c	45 s – 8 min ^d + 5 s cycle elongation for each successive cycle ^e	
Final Elongation	72°C ^c	7 min	1×
Cooling	4°C	unlimited time	

b) Optimal annealing temperature depends on the melting temperature of the primers and the system used.

c) For PCR products up to 3 kb elongation temperature should be +72°C; for PCR products larger than 3 kb elongation temperature should be +68°C.

d) Elongation time depends on fragment length: 45 s for up to 0.75 kb, 1 min for 1.5 kb, 2 min for 3 kb, 4 min for 6 kb, 8 min for 10 kb.

e) For example, cycle no. 11 is 5 s longer than cycle 10, cycle no. 12 is 10 s longer than cycle 10, cycle no. 13 is 15 s longer than cycle 10, etc.

Ⓢ The thermal profiles were developed for the Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9600. Other thermal block cyclers may require different profiles.

Protocol

Buffer Preparation

- ✓ *Before starting:* Add 24 ml 100% ethanol (26 ml 95% ethanol) to the 6 ml **DNA Wash Buffer** concentrate. Add 96 ml 100% ethanol (104 ml 95% ethanol) to the 24 ml **DNA Wash Buffer** concentrate.
- ✓ **DNA Wash Buffer** included with D4001S and D4001T is supplied ready-to-use and does not require the addition of ethanol prior to use.

Sample Processing

All centrifugation steps should be performed between 10,000 - 16,000 x g.

1. In a 1.5 ml microcentrifuge tube, add 2-7 volumes of **DNA Binding Buffer** to each volume of DNA sample (see table below). Mix briefly by vortexing.

Application	DNA Binding Buffer : Sample	Example
Plasmid, genomic DNA (>2 kb)	2 : 1	200 µl : 100 µl
PCR product, DNA fragment	5 : 1	500 µl : 100 µl
ssDNA ¹ (e.g. cDNA, M13 phage)	7 : 1	700 µl : 100 µl

For efficient recovery of genomic or large DNA (> 20 kb to > 200 kb), use the **Genomic DNA Clean & Concentrator[®]** (Cat. Nos. **D4010, D4011**).

2. Transfer mixture to a provided **Zymo-Spin™ Column²** in a **Collection Tube**.
3. Centrifuge for 30 seconds. Discard the flow-through.
4. Add 200 µl **DNA Wash Buffer** to the column. Centrifuge for 30 seconds. Repeat the wash step.
5. Add ≥ 6 µl **DNA Elution Buffer³** or water⁴ directly to the column matrix and incubate at room temperature for one minute. Transfer the column to a 1.5 ml microcentrifuge tube and centrifuge for 30 seconds to elute the DNA.

Ultra-pure DNA is now ready for use.

VEDLEGG 9 – FARE OG SIKKERHETSSETNINGER

Nedenfor presenteres fare- og sikkerhetssetninger for alle reagensene benyttet under oppgaven. Setningene er hentet fra SINTEFs registrerte datablader i EcoOnline.

Marine Broth

Ingen kjente farer.

Bacteriological Agar

Ingen kjente farer.

Glyserol

Ingen kjente farer.

TE Buffer

Ingen kjente farer.

Ready-Lyse Lysozyme

Ingen kjente farer.

Proteinase K (50 µg/µL)

H315 Irriterer huden.

H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.

H334 Kan gi allergi eller astmasymptomer eller pustevansker ved innånding.

P261 Unngå innånding av støv/ røyk/ gass/ tåke/ damp/ aerosoler.

P264 Vask hud grundig etter bruk.

P280 Benytt vernehansker/ vernebriller/ ansiktsskjerm.

P302 + P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann.

P304 + P340 VED INNÅNDING: Flytt personen til frisk luft og sørg for at vedkommende har en stilling som letter åndedrettet. Kontakt et GIFTINFORMASJONSSENTER/en lege ved ubehag.

P305 + P351 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern + P338 eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.

Gram Positive Lysis Solution (2X)

H315 Irriterer huden

H319 Gir alvorlig øyeirritasjon

H402 Skadelig for akvatiske miljøer

P264 Vask ... grundig etter bruk.

P273 Unngå utslipp til miljøet

P280 Benytt vernehansker /verneklær/øyevern/ansiktsvern.

P302+P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann

P305+P351+ VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter.

P338+P310 Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen. Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER/en lege/...

P332+P313 Ved hudirritasjon: Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER/en lege/...

MPC Protein Precipitation Reagent

Ingen kjente farer.

RNase A (5 µg/µL)

Ingen kjente farer.

Isopropanol

- H225 Meget brannfarlig væske og damp.
- H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.
- H336 Kan forårsake døsighet eller svimmelhet.
- P210 Holdes vekk fra varme, varme overflater, gnister, åpen ild og andre antenningskilder. Røyking forbudt.
- P233 Hold beholderen tett lukket.
- P305+P351+ P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Fortsett skyllingen.
- P501 Innhold/holder sorteres som farlig avfall. Skytt emballasje kan sorteres som plast.

Etanol (70%)

- H225 Meget brannfarlig væske og damp.
- H319 Gir alvorlig øyeirritasjon. Sikkerhetssetninger
- P210 Holdes vekk fra varme/gnister/åpen flamme/varme overflater. - Røyking forbudt.
- P243 Treff tiltak mot statisk elektrisitet.
- P280 Bruk vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm.
- P305+P351+ P338 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre. Forsett skyllingen.
- P403+P235 Oppbevares på et godt ventilert sted. Oppbevares kjølig

EB Buffer

Ingen kjente farer.

Q5 High-Fidelity 2X Mastermix

Ingen kjente farer.

Primer 1, S-D-Bact-1492

Ingen kjente farer.

Primer 2, S-D-Bact-0011

Ingen kjente farer.

Nuclease Free Water

Ingen kjente farer.

Agarose

Ingen kjente farer.

GelRed Nucleic Acid Gel Stain

Ingen kjente farer.

TAE Buffer (1X)

H373 Kan forårsake organskader ved langvarig eller gjentatt eksponering.
P260 Ikke innånd støv /røyk/ gass/ tåke/ damp/ aerosoler.
P313 Søk legehjelp.
P501 Innhold/ beholder leveres til godkjent forbrenningsanlegg.

Loading Buffer

Ingen kjente farer.

GeneRuler 1kb DNA Ladder

Ingen kjente farer.

Binding Buffer

H302 Farlig ved svelging.
H315 Irriterer huden.
H319 Gir alvorlig øyeirritasjon.
P264 Vask ... grundig etter bruk.
P270 Ikke spis, drikk eller røyk ved bruk av produktet
P280 – Benytt vernehansker /verneklær/øyevern/ansiktsvern.
P301 + P310 VED SVELGING: Kontakt umiddelbart et GIFTINFORMASJONSSENTER/
en lege/....
P302 + P352 VED HUDKONTAKT: Vask med mye vann/...
P305 + P351 VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i flere
P338 minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser dersom dette enkelt lar seg gjøre.
Fortsett skyllingen.
P330 Skyll munnen.
P362 + P364 Tilsølte klær må fjernes og vaskes før bruk

DNA Wash Buffer

Ingen kjente farer.

Mannitol

Ingen kjente farer.

Laminaran

Ingen kjente farer.

Alginat

Ingen kjente farer.

Fucoidan

Ingen kjente farer

VEDLEGG 10 - RISIKOVURDERING

RISIKOANALYSE (alternativ til bruk av RiskManager)

Enhet/Institutt:	SINTEF Industri, Avd Bioteknologi og nanomedisin, fg. Industriell og marin bioteknologi	Dato opprettet:	25.01.2022
Ansvarlig linjeleder (navn):	Håvard Sletta	Sist revidert:	18.05.2022
Ansvarlig for aktiviteten som risikovurderes (navn):	Anne Tøndervik		
Deltakere (navn):	Kari Hjelen		
Tilgjengelig(e) kontaktperson(er) under labarbeid (navn):	Anne Tøndervik		

Beskrivelse av den aktuelle aktiviteten, området mv.:

Risikoanalysen omfatter utstyr og kjemikalier som blir benyttet i forbindelse med gjennomføringen av bacheloroppgave. Arbeidsoppgavene er: tillaging av agarskåler flytende medium, dyrkning av ukjente bakterier, ekstrahering og rensing av DNA, kjøring av agarosegel, generell håndtering av kjemikalier og kjøring av BioLector.

Delaktivitet	Mulig uønsket hendelse	Eksisterende risikoreducerende tiltak	Vurdering av sannsynlighet (S) (1-5)	Vurdering av konsekvens (K)				Risiko-verdi (S x K)	Forslag til forebyggende og/eller korrigerende tiltak	Restrisiko etter tiltak (S x K)
				Menneske (1-5)	Øk/materiell (1-5)	Ytre miljø (1-5)	Om-dømme (1-5)			
Bruk av åpen flamme	Brannskader	Unngå bruk av etanol i nærheten av åpen ild, spesielt i forbindelse med bruk av hansker. Generell varsomhet.	2	3	1			6		
Arbeid med ukjente bakterier for dyrkning og DNA isolasjon	Oppdyrking av organismer klassifisert som Klasse 2 eller høyere. Mulige infeksjoner, eksponering for giftige eller infeksjose stoffer.	Jobb i avtrekk eller sterilbenk. Følge generelle rutiner om god mikrobiologisk praksis.	3	2				6		
Kjøring av DNA agarose gel farget med GelRed	Eksponering for kjemikalier	Bruk av hansker og labbriller under gelkjøring	2	1				2		
	Brannskade pga kontakt med varm agaroseløsning og mulig sprut under åpning.	Bruk av varmeisolerende hansker og vernebriller. Sørg for at lokket ikke sitter tett på flaskene under oppkoking av agaroseløsningen.	2	2				4		
	Eksponering for UV stråling	Bruk av øyebeskyttelse, langermete klær og skjerm	1	1				1		

DNA isolering og rensing	Eksponering for løsemidler og kjemikalier.	Bruk av hansker og vernebriller. Bruk av avtrekkskap og lukkede beholdere etter behov. Les sikkerhetsdatablad	1	1				1		
Sentrifugering	Personskade pga rotor som løsner under kjøring.	Nøyaktig balansering av prøverør etter krav ihht rotortype og sentrifugekopper. Korrekt montering av rotor. Bruk av G-kraft tilpasset rotor. Nyere sentrifuger stopper automatisk ved feil (ubalanse, for høy G-kraft).	2	1	1			2		
Lagring av prøver i fryseskap	Strømstans og medfølgende tapte prøver pga tining/oppvarming.	Frysere koblet til alarm.	2		2			4		
Håndtering av kjemikalier og løsninger, generelt	"Kjemikalier kan utgjøre en fare for arbeidstakers sikkerhet og helse. Det er ulike veier en arbeidstaker kan eksponeres for kjemikalier. Det kan skje ved innånding, gjennom huden, eller ved svelging. Hvor farlig eksponeringen er, avhenger av kjemikalienes egenskaper, nivå av eksponering, hvordan og hvor lenge man har blitt eksponert. Kjemikalier kan være akutt giftige, kreftfremkallende, mutagene (arvestoffskadelige), reproduksjonsskadelige, allergifremkallende, etsende og irriterende. Noen kjemikalier kan ha akutte effekter, mens andre kan gi helseplager eller sykdom etter lang tid, ofte flere tiår."	"SINTEF har et regelverk for kjemikalier. Dette omfatter klassifisering, merking og håndtering ihht gjeldende forskrifter (CLP og REACH). Datablad skal leses ved innledning til arbeid med nye kjemikalier og risikostoffer. Alt arbeid med farlige kjemikalier skal risikovurderes. Anbefalt verneutstyr skal benyttes og arbeid i avtrekk der dette kreves. Type verneutstyr avhenger av type kjemikalier. Ved bruk av kjemikalier som medfører særlig helsefare skal man følge gjeldene regelverk for det aktuelle kjemikallet. Ved arbeid med kjemikalier som krever registrering skal dette registreres i Eksponeringsregisteret. Hjelpemidler for arbeid med kjemikalier: EcoOnline (Stoffkartotek) Flytskjema for kjemikaliehåndtering (Link på forsiden) "	3	2				6		
Oppstart av BioLector	Klemskader	Opplæring før bruk av instrument	2	1				2		
Autoklaving av utstyr og løsninger	Brannskade på grunn av varme overflater eller væsker	Temperaturbestandige hansker er tilgjengelig	2	2				4	Vente til autoklav er temperert	2

