



DET TEKNISK-NATURVITENSKAPELIGE FAKULTET

BACHELOROPPGAVE

Studieprogram/spesialisering:

Biologisk Kjemi

Vårsemesteret, 2022

Åpen

Forfatter: Kursat Kan Akbas

.....
(signatur forfatter)

Fagansvarlig: Catrine Lillo

Veileder(e): Trond Løvdal

Tittel på bacheloroppgaven: Bakteriostatisk effekt av det nye bakteriosinet Garvicin KS

Engelsk tittel: Bacteriostatic effect of novel bacteriosin Garvicin KS

Studiepoeng: 20

Emneord: BIOBAC

Sidetall: 31

+ vedlegg/annet: 6

Stavanger, 15/05-2022
dato/år

Jeg vil gjerne takke Trond Løvdal og NOFIMA Stavanger som ga meg denne muligheten til å jobbe med dette på så kort varsel og all hjelpen dere ga meg i løpet av arbeidet. En takk til Cathrine Lillo som fikk hjelp meg med å få kontakt med Trond Løvdal og NOFIMA Stavanger.

Innholdsfortegnelse

Abstrakt	4
1. Introduksjon	4
1.1 Bakteriosiner	5
1.2 Nisin	5
1.3 Garvisin KS	5
2. Materials and methods	6
2.1 Dyrking av bakeriekulturer:	6
2.1.1 Fortynning av bakeriekulturer	6
2.1.2 Utplating av bakterier:	6
2.2 Bakteriosiner	7
2.2.1 Garvisin KS	7
2.3 Programmet for BioScreen C:	7
2.4 Eksperiment 1: Vekst av bakterier i 20°C	8
2.5 Eksperiment 2: Vekst av bakterier i 10°C	9
2.6 Eksperiment 3: Vekst av bakterie i 5°C	9
2.7 Eksperiment 4: Checkerboard analyse av Nisin og GarKS	10
2.8 Experiment 5: Vekst av <i>Listeria</i> i CSS i 4°C	10
2.9 Analyse av data	11
2.10 Statistikk.....	12
3. Results & Diskusjon:.....	13
3.1 Eksperiment 1 (BioScreen 20°C):	13
3.1.1 <i>B. cereus</i> 144:.....	13
3.1.2 <i>B. cereus</i> CCUG 10781	13
3.1.3 <i>B. licheniformis</i> NVH1032:.....	14
3.1.4 <i>B. licheniformis</i> NVH-B357.....	14
3.1.5 <i>B. subtilis</i> PS533	16
3.1.6 <i>B. pumilus</i> B367	17
3.1.7 <i>B. weihenstephanensis</i> 539.....	17
3.1.8 <i>C. inhibens</i>	17
3.1.9 <i>C. maltaromanticum</i>	17
3.1.10 <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212).....	18
3.1.11 <i>L. innocua</i> ATCC 33090:	18
3.1.12 <i>L. innocua</i> CCUG 35613:.....	18
3.1.13 <i>S. aureus</i> ATCC 33862:	19
3.2 Eksperiment 2 (Synergy 10°C):.....	19
3.2.1 <i>B. cereus</i> 144:.....	19
3.2.2 <i>B. cereus</i> CCUG 10781	21
3.2.3 <i>B. subtilis</i> PS533	21
3.2.4 <i>B. weihenstephanensis</i> 539.....	21
3.2.5 <i>C. maltaromanticum</i>	21
3.2.6 <i>L. innocua</i> ATCC 33090:	22
3.2.7 <i>S. aureus</i> ATCC 33862:	22
3.3 Eksperiment 3 (Synergy 5°C):.....	22
3.4 Eksperiment 4 (Checkerboard analyse 20°C):	22

3.4.1 <i>B. cereus</i> 144:.....	22
3.4.2 <i>B. licheniformis</i> NVH-B357.....	24
3.4.3 <i>C. maltaromanticum</i>	24
3.4.4 <i>L. innocua</i> ATCC 33090:.....	24
3.4.5 <i>S. aureus</i>	25
3.5 Eksperiment 5 (Challenge forsøk):	25
3.5.1 Dosering i forhold til regelverket.....	26
3.6 METODEEVALUERING	27
3.6.1 Resultater ved 10°C.....	27
4. KONKLUSJON	27
5. Kilder.....	29
Appendix	32

Abstrakt

Den bakteriostatiske effekten av det nye bakteriosinet Garvisin KS (GarKS), som har blitt isolert fra *Lactococcus garvieae*, og synergien mellom denne og Nisin på noen utvalgte gram-positive bakterier fra slektene *Bacillus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* og *Listeria* ble undersøkt. Testene ble utført ved hjelp av absorpsjonsmålinger (600 nm Abs) i microplatelesere (BioScreen C og Synergy) ved 20°C, 10°C, og i Challenge forsøk med 2 stammer av *L. innocua* ved ~4°C med kaldrøkt laks (Cold smoked salmon ;CSS).

Det ble målt hvor mye vekst det var i bakteriekulturer som var tilsatt bakteriosiner, og om det var signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene innad i bakteriekulturene med et konfidensintervall på 95%. Det ble sjekket hvordan effekten til Garvisin KS var på røkt laks som hadde blitt tilsatt 2 forskjellige stammer av *L. innocua*, og tilleggseffekten den hadde når Nisin også var til stede. Det har både vært tegn til synergi og til antagonisme ved bruk av nisin og/eller Garvisin KS som behandlingsmetoder.

1. Introduksjon

Et viktig mål for framtida er å gjøre slik at mat får lengre holdbarhet og at det blir mindre bakterievekst. Dette fører til at det blir mindre matsvinn, som fører til at penger blir spart fordi mindre kastes. Hvis mindre mat kastes trengs det heller ikke å bli produsert like store mengder fordi maten vi har holder lengre. Mindre bakterievekst vil si at det også er tryggere å spise maten. Man kan unngå sykdommer som er forårsaket av patogene bakterier i maten hvis man har bedre konserveringsmidler. Ifølge WHO så er det estimert 23 millioner mennesker som blir syke pga kontaminert mat og av disse dør ca. 5000 i Europa hvert år (WHO, 2017).

Ifølge WHO er antibiotika resistens i en av de største truslene mot verdenshelsen, matsikkerheten og mattryggheten (WHO, 2020). Grunnen til at antibiotikaresistens i bakterier har blitt så utbredt er misbruk og overforbruk av antibiotika i forskjellige sektorer. Bakteriene som er resistente mot antibiotika gjør at infeksjonene og sykdommene de forårsaker blir vanskeligere å behandle enn det de opprinnelig var. Det har derfor blitt enda viktigere å utvikle nye metoder for å kjempe disse patogene antibiotikaresistente bakteriene. Bakteriosiner kan bli sett på som et av de nye alternativene for bruk av konserveringsmiddel i mat

1.1 Bakteriosiner

Bakteriosiner er antibakterielle proteiner produsert av bakterier for å drepe eller inhibere veksten av andre bakterier (Cleveland J et al., 2001). Bakteriosiner bruker antimikrobielle mekanismer som er forskjellige fra de antibiotika bruker. Bakteriosiner er membran-aktive antimikrobieller, som vil si at de dreper de cellene de retter angrepet mot ved å forstyrre membranintegriteten til disse cellene, som videre fører til cellenes død (Kjos M et al., 2011). Denne metoden for handling gjør at de kan være aktive mot både bakterier som er sensitive mot antibiotika og deres antibiotikaresistente motparter (Ovchinnikov KV et al., 2016).

Melkesyrebakterie bakteriosinene har blitt påvist til å være trygge, og har potensiale som effektive naturlige konserveringsmidler for mat. Selve melkesyrebakteriene blir også generelt sett, sett på som trygge (U.S. FDA, 2018; Cleveland J et al., 2001). Dette har ført til at de er de mest studerte bakteriosinene. Til tross for potensialet til bakteriosiner i bruk som konserveringsmiddel i mat, og flere tiår med forskning, er nisin fortsatt den eneste bakteriosinen som er autorisert for forbruk av mennesker av Food and Drug Administration (FDA) og European Food Safety Authority (EFSA).

1.2 Nisin

Nisin er tatt i bruk som tilsetningsstoff i over 50 land. Den har vært i bruk i over 60 år (Deegan et al., 2006). Det er fortsatt begrensninger på hva slags mat Nisin er tillatt å ha i (noe former for melkeprodukter og varmebehandlet kjøtt), og også mengden Nisin som er tillatt å ha i disse. Det har i de siste årene vært mange studier for å undersøke hvor mye nisin mennesker tåler, og for å flytte grensa på tillatt nisin i mat (Younes M et al., 2016).

Det blir forsket på andre bakteriosiner som har samme/bedre effekt på patogener enn de vi bruker i dag. Observasjonene fra forskningen og utviklingen av nisin har blitt brukt i senere studier for andre bakteriosiner også. Det blir også forsket på synergien som forskjellige bakteriosiner har med hverandre og også andre antimikrobieller. Dette er for å ha et bredere spektrum av matvarer som kan ha bakteriosiner i seg som en av konserveringsmidlene.

1.3 Garvisin KS

Garvisin KS er isolert fra *L. garvieae* funnet i rå melk. Den består av tre lederløse peptider kalt GakA, GakB og GakC, og alle tre er nødvendig for å få full effekt av den antimikrobielle aktiviteten til bakteriosinet (Ovchinnikov KV et al., 2016). Garvisin KS. Det er ganske få bakteriosiner som har et bredt antimikrobielt spekter. Garvisin KS er en av bakteriosinene som har et veldig bredt

antimikrobielt spekter, noe som vil si at den har et meget stor potensiale når det kommer til bruk innen matindustrien og medisin. Antimikrobielle spekteret til garvisin KS inneholder også problematiske bakterier fra slektene *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* og *Enterococcus*. (Ovchinnikov KV et al., 2016; Chi H og Holo H, 2018). Garvisin har også i kombinasjon med andre antimikrobieller vist en synergisk effekt og i tillegg redusert mengden dose som trengs i behandlingen (Chi H og Holo H, 2018).

2. Materials and methods

2.1 Dyrking av bakteriekulturer:

Bakteriene ble tilsatt til 50 mL Tryptic soya broth (TSB) med 0.6% gjær ekstrakt (TSBYE, Oxoid). Bakteriene ble inkubert i 30°C med roterende omrøring (150 rpm). Etter ca. 24 timer ble det overført 500 µL fra de bakteriekulturene til nye steriliserte erlenmeyerkolber med 50 mL TSBYE, og så inkubert over natten i 30°C med roterende omrøring (150 rpm). Disse over natten kulturene hadde en konsentrasjon på ca. 10^9 cfu/mL.

Bakteriekulturene som ble brukt var opprinnelig oppbevart i -80°C og var fra Trond Løvdal ved NOFIMA sin samling av bakteriestammer. I de senere testene ble det tatt fra nye kulturer laget fra de opprinnelige, som ble korttidsoppbevart i ca. -20°C. Det er disse som ble brukt i alle resultatene.

2.1.1 Fortynning av bakteriekulturer

Overnatten kulturene som ble brukt i forsøkene ble så fortynnet til 10^{-6} ($\sim 10^3$ cfu/mL). Det ble gjort med 0.6 % TSBYE i Falconrør, som ble vendt opp ned noen ganger for å få en homogen blanding.

2.1.2 Utplating av bakterier:

Utplatingene i forsøk 1, 2 og 3 (og 4) ble gjort på samme måte. Det var i petriskåler med Tryptone soya agar (TSA) med 0,6% gjær ekstrakt (TSAYE, Oxoid). 10^{-6} fortynningene ble fortynnet til 10^{-7} fortynninger med autoklavert Milli-Q vann. Disse to fortynningene ble ved hjelp av EddyJet sådd ut på petriskålene med 2 paralleller hver. Disse ble etter de hadde tørket plassert i inkuberingskap på 30°C i 2 døgn (ca. 48 timer), før de ble tatt ut og telt slik at vi kunne regne ut konsentrasjonen (cfu/mL) til bakteriene.

2.2 Bakteriosiner

Det ble deretter klargjort stamløsning av Nisin A (Sigma; N5764-1G) og GarKS. Garvisin KS'en fikk vi fra Dzung Diep's lab ved NMBU. Nisin stamløsningen var 50 mg/mL som tilsvarer 1250 µg/mL aktiv reagent og denne ble fortynnet med autoklavert 0.02 M HCL til en nisinløsning med aktiv reagenskonsentrasjon på 32 µg/mL. Konsentrasjonen til GarKS var 32 µg/mL.



Bilde 1: Bilde av bakteriekulturene i erlenmeyerkolber mens de blir inkubert i inkuberingsrister.



Bilde 2: Nisin A blir veid opp for å lage en stamløsning. Det oppveide niset ble løst i 1 mL 0.02 M HCl.

2.2.1 Garvisin KS

Siden det så ut til å være rester av bakterier, som vi tror er fra *Lactococcus garvieae* (bakterien Garvisin KS er hentet fra) i GarKS'en vi brukte ut ifra første gang vi prøvde å kjøre BioScreen C, bestemte vi oss for å sette de i vannbad i 95°C i ca. 10 min for å fjerne dette. Det så ut til å fungere ut ifra at det ikke ble noe vekst i blank m/GarKS i forsøkene som ble gjort. Det ble overført 1 mL GarKS til 1,5 mL eppendorfrør, som etter oppvarmingen ble satt rett på is for å kjøles ned før bruk.

2.3 Programmet for BioScreen C:

Programtemplatet til BioScreen var satt opp slik: 20°C i kassetten og 21°C i coveret. Målingene ble gjort ved 600 nm Abs hvert 10. minutt, med medium intensitet risting og ca. 10 sek risting før målingene.

2.4 Eksperiment 1: Vekst av bakterier i 20°C

Bakteriestammene er hentet fra forskjellige steder. Noen er fra mikrobielle kulturlagre, mens andre er fra samlingene til enkeltpersoner. American Type Culture Collection (ATCC) og Culture Collection University of Gothenburg CCUG er de to kultursamlingene de fleste av våre stammer er hentet fra (Tabell 1). Resten av stammene kommer fra følgende steder: *B. cereus* NVH 1230-88 er isolert fra en orientalsk stuing involvert i mat forgiftning (Ehling-Schulz M et al., 2005); *B. licheniformis* NVH 1032 isolert fra mat (Borch-Pedersen et al., 2017); *B. licheniformis* NVH-B357 isolert fra drikkevann i Maridalen, Norge (Løvdaal I.S. et al, 2012); *B. subtilis* PS533 er en vel karakterisert laboratoriestamme av *B. subtilis* 168 (Ghosh S and Setlow P, 2009); *B. pumilus* NVH 819-05 er isolert fra ris implisert i en matforgiftnings utbrudd (From et al., 2007); *B. weihenstephanensis* WSBC 10391 er isolert fra melk (Stenfors LP et al., 2002).

Det ble brukt 13 forskjellige bakteriestammer (se Tabell 1) i eksperiment 1:

Bakterie	(Opprinnelse)	Temp. Min.	Temp. Max.	Referanse
1. <i>Bacillus cereus</i> 144	NVH1230-1988	4 °C	55 °C	[25]
2. <i>Bacillus cereus</i>	CCUG 10781 (=ATCC 11778)	4 °C	55 °C	[25]
3. <i>Bacillus licheniformis</i>	NVH1032 ('Picnic')	11-15 °C	50-55 °C	[14, 24]
4. <i>Bacillus licheniformis</i> B357	NVH-B357	11-15 °C	50-55 °C	[14, 24]
5. <i>Bacillus subtilis</i> PS533	Peter Setlow	5,5 °C	55,7 °C	[8, 14]
6. <i>Bacillus pumilus</i> B367	NVH819/05	5-15 °C	40-50 °C	[7, 22]
7. <i>Bacillus weihenstephanensis</i> 539	WSBC 10391	7 °C	43 °C	[14, 13]
8. <i>Carnobacterium inhibens</i>	CCUG 31728T	<2 °C	-	[10]
9. <i>Carnobacterium maltaromaticum</i>	CCUG 30142T	<2 °C	-	[1, 12]
10. <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212	~10 °C	-	[22]
11. <i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090 (=CCUG 15531)	4 °C	-	[16, 17, 20]
12. <i>Listeria innocua</i>	CCUG 35613 (=ATCC 51742)	4 °C	-	[16, 17, 20]
13. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862	7 °C	50 °C	[25]

Tabell 1: Tabellen viser Bakteriestammene som ble brukt i forsøket, hvor isolatet kommer fra, minimums- og maksimums temperaturen de vokser i.

Klargjøring i eppendorfrør (Eksperiment 1, 2 og 3)

Fra hver bakteriestamme (~10³ cfu/mL fortytning) ble det tatt 3 paralleller med hver fortytning + enten HCl (Kontroll), Nisin, GarKS eller Nisin+GarKS. Konsentrasjonen til bakteriosinene som ble tilsatt var ca. 32 mg/L aktiv reagens. Det ble tilsatt 969 µL av hver fortytning til tre eppendorfrør, og til disse ble det tilsatt henholdsvis 31 µL av HCl, Nisin eller GarKS. Disse fikk en endelig konsentrasjon på 1 µg/mL aktiv reagens av bakteriosinet. Til et fjerde eppendorfrør ble det tilsatt 938 µL av fortytningen og 31 µL av hver bakteriosin slik at vi fikk ca. 1 µg/mL aktiv reagens per

bakteriosin og en total konsentrasjon på 2 µg/mL aktiv reagens. Fra eppendorfrørene ble det tatt ut 200 µL og tilsatt til hver brønn med 3 paralleller hver. (Se appendix Figur 2 for oppsettet til mikrotiterplaten). Etter alt av kontroll, bakterier og blank var tilsatt brønnen ble det startet en måling av vekst vha BioScreen C som varte i 5 dager. Hver stamme ble så utplatet og telt.

2.5 Eksperiment 2: Vekst av bakterier i 10°C

Ut ifra eksperiment 1 ble det valgt ut 7 bakterier som ble gjort klar på samme måte som i eksperiment

1. Disse 7 bakteriene var: (fra Tabell 1: 1, 2, 5, 7, 9, 11 og 13).

1. *B. cereus* 144
2. *B. cereus* CCUG 10781
3. *B. subtilis* PS533
4. *B. weihenstephanensis* 539
5. *C. maltaromanticum* CCUG 30142T
6. *L. innocua* ATCC 33090
7. *S. aureus* ATCC 33862

De ble klargjort i eppendorfrør på samme måte som forsøk 1. Fra disse ble det overført 150 µL til 3 og 3 paralleller i mikrotiterplatene. Det ble tatt en måling av denne vha multiplateleser (Synergy) i 600 nm Abs, før platen ble satt i skap med 10°C som temperatur mellom hver måling. Etter det ble det tatt en måling etter 3 timer, før den ble satt tilbake i skapet. Deretter ble det i ca. 10 dager tatt målinger hver 3. time 3 ganger fra 08-09 og en måling på kveldstid 19-21. På samme måte som i eksperiment 1 ble disse utplatet og telt.

2.6 Eksperiment 3: Vekst av bakterie i 5°C

Samme som eksperiment 2 bare at inkuberingsskapet var på 5°C istedenfor 10°C. Grunnet vekst i blank før kontrollene, ble forsøk droppet

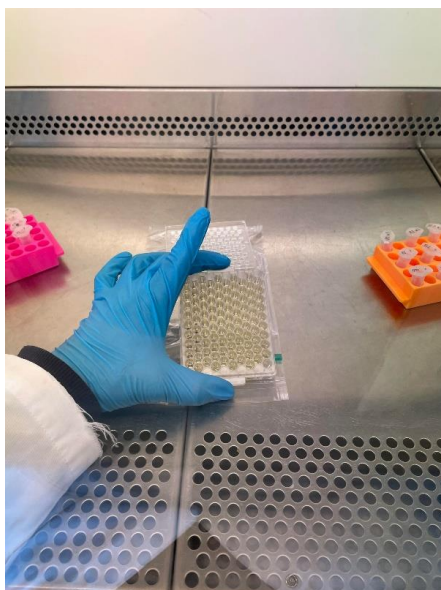
2.7 Eksperiment 4: Checkerboard analyse av Nisin og GarKS

Bakteriekulturene ble gjort klar på samme måte som eksperiment 1, 2 og 3. Overnattkulturen ble fortynnet til 10^{-6} . Hver bakterie ble delt ut i 6 eppendorfrør rør og tilsatt slike mengder bakteriosiner (se Tabell 2)

Behandling	A	B	C	D	E	F
Totalt volum	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L	1000 μ L
Nisin	0 μ g/mL	0,5 μ g/mL	1 μ g/mL	1,5 μ g/mL	2 μ g/mL	0 μ g/mL
Garvisin KS	2 μ g/mL	1,5 μ g/mL	1 μ g/mL	0,5 μ g/mL	0 μ g/mL	0 μ g/mL

Tabell 2: Tabell med oversikt over hvor mange volum TSBYE 0,6% YE + bakteriosin hver behandlingsgruppe i forsøk 4 ble tilsatt og hva behandlingene ble kalt.

Det ble så tatt ut 200 μ L fra hver eppendorfrør og tilsatt 3 og 3 paralleller i hver brønn i mikrotiterplaten. I tillegg var det 3x3 brønner mer blank (medium, med+Nisin og med+GarKS), (Bilde 3). Mikrotiterplaten ble satt inn i BioScreen C, og målt i 7 dager. (for oppsett av mikrotiterplate sjekk appendix Figur 3). Til slutt ble stammene utplatet og telt.



Bilde 3: Mikrotiterplate som har blitt tilsatt blandingene av prøvene som skal måles i BioScreen C.

2.8 Experiment 5: Vekst av *Listeria* i CSS i 4°C

Kaldrøyt laks (Cold Smoked Salmon; CSS) ble kuttet opp i ca. 10 g store biter, og puttet i små sterile vakuumposer.

Inokulering med *L. innocua*:

Dyrker opp kultur av *L. innocua* til ca. 10^9 cfu/mL. (De to stammene vi brukte ble blandet sammen se Tabell 1). Pelleterte av 1 mL av kulturen og resuspenderte den i 40 mL 1 \times Phosphate Buffered Saline

(PBS). Dette gir en konsentrasjon på ca. 10^7 cfu/mL. Deretter ble det laget en 10^{-3} fortyning av denne (10^4 cfu/mL) med PBS. Pipetterte så 250 μ L på hver side av CSS porsjonen inne i vakuum posen, og sørget for at denne fordelte seg jevnt over hele porsjonen. I tillegg til disse ble det pipettert 312 μ L av HCl, Nisin, GarKS og Nisin+GarKS på hver side av CSS, og fordelt over hele porsjonen. Det ble også laget en med bakgrunn flora med Milli-Q vann (dH_2O), uten bakteriosiner og uten bakterier for å sjekke at fisken ikke var kontaminert fra før. Posene ble liggende i LAF-benk i 5 min før forsegling. Disse ble vakuumforseglet med vakuummaskin før de ble satt i kjøleskapet ved $4^\circ C$.

Uttak:

Det ble gjort uttak hver 7. dag. Tok ut 2 poser med laks bakgrunn, klippet opp posen og tok hele laksebitten oppi en Stomacher pose med filter som sto på en vekt for å veie den. Posen ble så fylt med bufret peptonvann opp til vekten av laksebitten $\times 10$ (f.eks: 9,7 g \rightarrow 97 \pm 1 g). Deretter settes posen med laks oppi Stomacher maskinen for å bli homogenisert i 120s.

Væsken ble overført til en 15 mL Falcon rør (nok mengde homogenat for hele forsøket). Denne væsken regnes med å være en 10^{-1} fortyning. Det ble overført 100 μ L fra denne til en petriskål (Listeria Brilliance skåler, Oxoid) per parallell og spredd ut med sterilspreder.

Det ble tatt ut 3 poser/paralleller av Kontroll, Nisin, GarKS og Nisin+GarKS. Den samme prosessen for spredning ble brukt her. Det ble laget 2 paralleller til hver laksebit. En der 100 μ L homogenat ble spredd ut med sterilspreder, og en som ble utplatet på petriskåler med EddyJet. Petriskålene ble etter de har tørket inn satt i inkuberingskap på $37^\circ C$. Etter 48 t ble de tatt ut og antall kolonier ble telt. I de senere uttakene ble den homogene væsken med bakterier også fortynnet. Dette ble gjort med autoklavert Milli-Q vann.

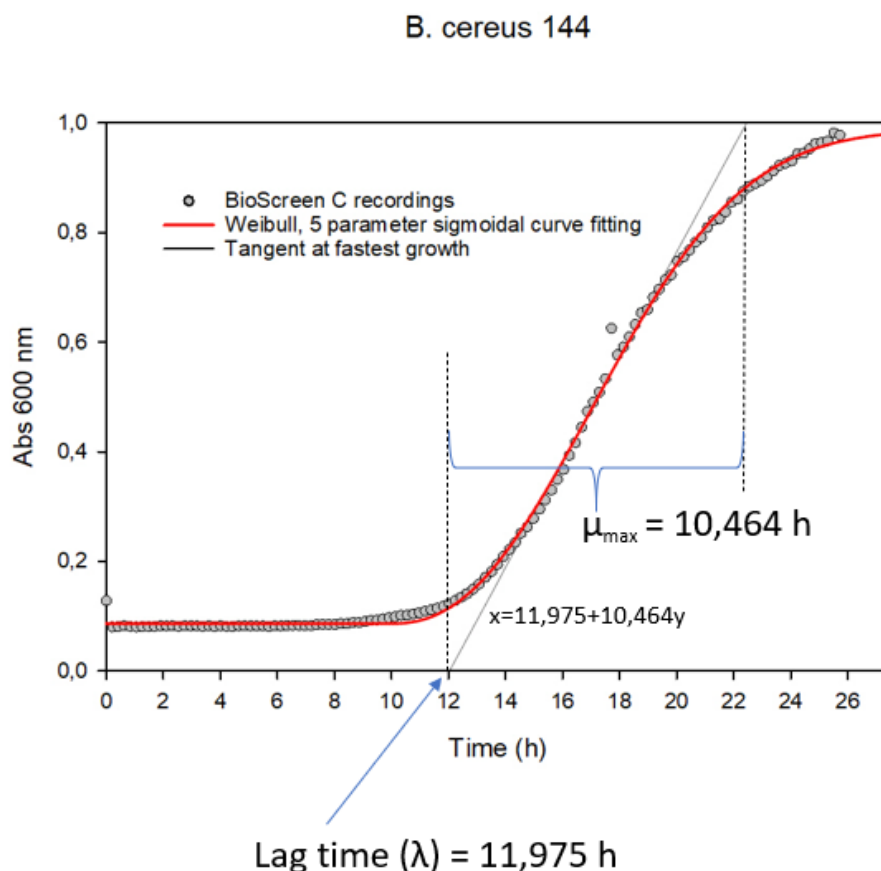
2.9 ANALYSE AV DATA

Dataene som ble registrert fra BioScreen C og Synergy ble eksportert til Excel der de ble prosessert. Det ble lagt til tid fra start i timer, og gjennomsnittet av absorpsjon hos de tre parallellene ble regnet ut. Lag tiden (λ) og vekstraten (μ) ble regnet ut (avledet) fra vekstkurvene som vi fikk ved hjelp av Weibull fem-parameter ligningen for sigmoid fordeling (Saha et al., 2017):

$$y = y_0 + a \left[1 - e^{-\left(\frac{(x-x_0 + b \ln 2)^{\frac{1}{c}}}{b}\right)^c} \right], \quad b > 0, c > 0,$$

Hvor a er overgangshøyden, b er overgangssenteret og $2^c(\ln 2)^c - c(2\ln 2 - \ln 3)^c$ er overgangsbredden. Kurvetilpassningen for Weibull ble gjort i SigmaPlot (v14.5) som tidligere beskrevet i Saha et al. (2017). λ er symbolet for lagtid, som er i mikrobiologi definert som den perioden bakterien bruker for

å bli vant til omgivelsene før den starter å vokse. På Figur 1 ser vi at det er det punktet tangenten krysser x-aksen. μ er stigningstallet til tangenten (tid for å øke ABS med 1 enhet).



Figur 1: Weibull fem-parameter ligningen for sigmoid fordeling laget av målingen for *B. cereus* 144 med BioScreen ved 600 nm ABS. Denne modellen ble brukt for å finne lag tid (λ) og μ (vekstrate) vises.

2.10 STATISTIKK

ANOVA analyse av variansen (One-way of analysis of variance) ble utført i SigmaPlot for λ og μ for å sjekke om det var en statistisk signifikans mellom de forskjellige behandlingene for samme bakteriestamme. For de parvise behandlingene som besto normalitetstesten ble en sammenligning utført med Holm-Sidak metoden på et konfidensintervall på 95%. De dataene som ikke besto normalitetstesten, ble først forsøkt å log transformeres og så forsøkt normalitetstest igjen. Dersom dette ikke gikk ble ANOVA on ranks (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks) utført. Med dataene herifra ble en parvis sammenligning med Tukey test utført for å sjekke om det er signifikante forskjeller eller ikke. (All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Tukey Test)). Siden ANOVA on ranks er minde følsom når man har få paralleller ble T-test brukt i tvilstilfeller. T-test brukes for å sjekke om det er signifikante forskjeller mellom gjennomsnittsverdiene i to datasett. I de tilfellene der det ikke var noe vekst, ble en minimumsverdi som tilsvarte hvor lenge

forsøket hadde pågått satt. Det ble gjort slik at vi kunne bruke de parallellene i den statistiske analysen.

3. Results & Diskusjon:

Resultatene i Tabell 3 er fra målingene til BioScreen C ved 20°C, Tabell 4 målingene fra Synergy ved 10°C og Tabell 5 målingene fra Checkerboard analysen ved 20°C (Bioscreen C).

3.1 Eksperiment 1 (BioScreen 20°C):

Det som kommer til å bli presentert i denne delen er resultatene fra BioScreen C målinger ved 20°C som vi finner i Tabell 3.

3.1.1 *B. cereus* 144:

Siden variansen av gjennomsnittet \pm standardavvik mellom de forskjellige behandlingene er såpass stor at det er lite sannsynlighet for at det er en tilfeldighet. Som vi ser på (Tabell 3) er den statistiske signifikante forskjellen mellom alle behandlingene mindre $p < \sim 0.001$. Det var kontrollen som hadde kortest lag tid av alle testene (11,9 t), behandlingene med Nisin (15,2 t) og Garvisin KS (15,9 t) hadde ganske likt lag tid, men standardavvikene er så små at de er signifikant forskjellige. Behandlingene med Nisin+GarKS (16,8 t) er de som hadde lengst lag tid. Det var ingen signifikante forskjeller mellom μ for de ulike behandlingene (Tabell 3).

3.1.2 *B. cereus* CCUG 10781

Gjennomsnittet for lag tid på de forskjellige behandlingene var: Kontroll (16,3 t), Nisin (ingen vekst = 118, 0 t), GarKS (18,9 t) og Nisin+GarKS (25,7 t) (Tabell 3). Det var en signifikant forskjell mellom Nisin mot kontroll ($P \leq 0,012$). Det var ingen signifikant forskjell mellom de andre behandlingene siden $p > 0,05$ for alle. Utførte en T-test for lag tid: Signifikante forskjeller ($p < 0,001$) mellom alle behandlingene, der Nisin er signifikant lengre enn de andre behandlingene, Kontroll er signifikant kortere enn de andre. I tillegg til dette er Nisin \pm GarKS signifikant lengre enn GarKS. Fra Tabell 3 ser vi at μ verdiene til Kontroll = 9,9, GarKS = 9,6 og Nisin+GarKS = 12,1. Etter sammenligning ser vi at det er signifikant forskjell mellom Nisin+GarKS mot GarKS ($p \leq 0,029$) og mot Kontroll ($p \leq 0,048$) hvor Nisin+GarKS er signifikant lengre enn begge, og ingen signifikant forskjell mellom Kontroll og GarKS. Her ser det ut som om de behandlings parallellene som har blitt

tilsatt Nisin er de som har best hemmende effekt for lag tid. Dette inkluderer Nisin+GarKS også, men det er ingen tilsynelatende synergi mellom disse to bakteriosinene. Tvert imot blir effekten enda dårligere. Dette er et fenomen kalt antagonisme.

3.1.3 *B. licheniformis* NVH1032:

Gjennomsnittlig lag tid for kontrollen var 34,8 t som var signifikant kortere ($p < 0,001$) enn både Nisin på 50,6 t og Nisin+GarKS på 43,1 t. Den var derimot ikke signifikant forskjellig fra GarKS på 34,5 t. Nisin+GarKS var signifikante kortere enn Nisin ($p < 0,001$), men signifikant lengre GarKS ($P < 0,001$), og mellom Nisin og GarKS ($p < 0,001$) var Nisin signifikant kortere.

Det er også signifikante forskjeller ($p < 0,001$) for μ mellom Nisin+GarKS mot Kontroll, mot Nisin og mot GarKS der Nisin+GarKS er signifikant lengre enn alle. Kontroll var signifikant kortere enn GarKS ($p \leq 0,036$), men det var ingen signifikante forskjeller mellom Kontroll mot Nisin ($p \leq 0,060$).

Det er heller ingen signifikant forskjell mellom Nisin og GarKS ($p \leq 0,559$).

For lag tid har GarKS ingen effekt, mens Nisin har bedre effekt. Sammen ser det ut som om den har motvirkende effekt. Ut ifra resultatene har Nisin og GarKS en liten effekt på μ , men i synergi med hverandre virker det som om den har en enda større effekt på μ , som gjør at den er signifikant lengre enn de andre behandlingene (behandlingsmåtene). Det kan være verdt med flere forsøk for å bekrefte hvor bra synergien er.

3.1.4 *B. licheniformis* NVH-B357

Fra Tabell 3 ser vi at det var ingen vekst for Nisin i løpet av de 118 timene forsøket pågikk, lag tiden for de statistiske analysene settes derfor til 118 t. Nisin er derfor signifikant større ($p < 0,001$) enn de andre testene som hadde vekst: Kontroll (51,8 t), GarKS (53,8 t) og Nisin+GarKS (67,9 t). Det var også signifikante forskjeller mellom alle de andre behandlingene også, men mellom Gar KS og Kontroll er den marginalt ($p \leq 0,048$), der Kontroll var signifikant kortere enn GarKS. Resten av behandlingene hadde en signifikant forskjell ($p < 0,001$) hvor Nisin+GarKS var signifikant lengre enn GarKS og Kontroll. For μ var det ingen resultater for Nisin (Ingen vekst i noen av parallellene), men for resten var den korteste Kontrollen ($\mu = 28,2$), i midten var GarKS ($\mu = 31,0$) og Nisin+GarKS var den lengste ($\mu = 47,6$). Mellom disse var det signifikante forskjeller for alle behandlingene. (Tabell 3) Her ser det ut som behandlingen med bare Nisin hadde bedre effekt enn behandlingene med GarKS eller de med Nisin+GarKS. Så det å ha en kombinasjon av disse to bakteriosinene kan kanskje motvirke inhiberingen Nisin gjør for seg selv. Det ser derfor ut som om det er en antagonistisk effekt.

Tabell 3: Gjennomsnitt av 3 paralleller \pm standardavvik (SD) for λ og μ hentet fra kurvetilpasset Weibull data eksperiment 1.

Bakterieart	Behandling	λ (i timer) \pm SD*	$\mu \pm$ SD*	R ²	SSE
<i>B. cereus</i> 144					
	Kontroll	11,86 \pm 0,10 ^{BCD}	10,65 \pm 0,16	0,9995	0,0066
	Nisin	15,22 \pm 0,25 ^{ACD}	10,77 \pm 0,22	0,9996	0,0057
	Garvisin KS	15,89 \pm 0,18 ^{ABD}	10,90 \pm 0,03	0,9997	0,0046
	Nisin & Garvisin KS	16,81 \pm 0,09 ^{ABC}	10,69 \pm 0,11	0,9998	0,0040
<i>B. cereus</i> CCUG 10781					
	Kontroll	16,26 \pm 0,17 ^{BCD}	9,95 \pm 0,59 ^D	0,9998	0,0033
	Nisin	118^{ACD}	--	--	--
	Garvisin KS	18,93 \pm 0,31 ^{ABD}	9,60 \pm 0,75 ^D	0,9999	0,0030
	Nisin & Garvisin KS	25,71 \pm 0,59 ^{ABC}	12,07 \pm 0,75 ^{AC}	0,9997	0,0047
<i>B. licheniformis</i> NVH1032					
	Kontroll	34,75 \pm 0,16 ^{BD}	26,42 \pm 0,43 ^{CD}	0,9998	0,0042
	Nisin	50,57 \pm 0,16 ^{ACD}	27,29 \pm 0,63 ^D	0,9997	0,0038
	Garvisin KS	34,51 \pm 0,40 ^{BD}	27,49 \pm 0,24 ^{AD}	0,9992	0,0073
	Nisin & Garvisin KS	43,06 \pm 0,45 ^{ABC}	32,68 \pm 0,11 ^{ABC}	0,9997	0,0046
<i>B. licheniformis</i> NVH-B357					
	Kontroll	51,78 \pm 1,48 ^{BCD}	28,19 \pm 1,18 ^{CD}	0,9915	0,0174
	Nisin	118^{ACD}	--	--	--
	Garvisin KS	53,78 \pm 1,16 ^{ABD}	31,03 \pm 0,60 ^{AD}	0,9955	0,0221
	Nisin & Garvisin KS	67,86 \pm 0,94 ^{ABC}	47,65 \pm 1,83 ^{AC}	0,9881	0,0221
<i>B. subtilis</i> PS533					
	Kontroll	23,64 \pm 0,49 ^{BD}	25,30 \pm 0,44 ^{BCD}	0,9790	0,0216
	Nisin	32,54 \pm 0,58 ^{ACD}	23,85 \pm 0,21 ^A	0,9749	0,0167
	Garvisin KS	23,87 \pm 0,10 ^{BD}	23,34 \pm 0,10 ^A	0,9957	0,0124
	Nisin & Garvisin KS	30,11 \pm 0,43 ^{ABC}	23,79 \pm 0,57 ^A	0,9879	0,0198
<i>B. pumilus</i> B367					
	Kontroll	20,42 \pm 1,00 ^{BCD}	10,37 \pm 0,49 ^C	0,9867	0,0174
	Nisin	36,21 \pm 1,02 ^{ACD}	10,62 \pm 1,69 ^C	0,9974	0,0133
	Garvisin KS	30,20 \pm 1,02 ^{ABD}	17,19 \pm 1,46 ^{AB}	0,9942	0,0188
	Nisin & Garvisin KS	33,88 \pm 1,01 ^{ABC}	13,55 \pm 3,28	0,9927	0,0226
<i>B. weihenstephanensis</i> 539					
	Kontroll	19,32 \pm 0,08 ^{BCD}	11,63 \pm 3,02	0,9944	0,0173
	Nisin	118^{AC}	--	--	--
	Garvisin KS	23,82 \pm 1,00 ^{ABD}	16,47 \pm 2,88	0,9960	0,0128
	Nisin & Garvisin KS	118^{AC}	--	--	--
<i>C. inhibens</i> CCUG 31728T					
	Kontroll	36,97 \pm 0,15	15,98 \pm 6,6	0,9922	0,0207
	Nisin	n/a	--	--	--
	Garvisin KS	n/a	--	--	--
	Nisin & Garvisin KS	n/a	--	--	--

(Fortsetter)

Bakterieart	Behandling	λ (i timer) \pm SD	$\mu \pm$ SD	R ²	SSE
<i>C. maltaromanticum</i> CCUG 30142T					
	Kontroll	21,43 \pm 0,13 ^{BCD}	15,67 \pm 0,21 ^{BCD}	0,9855	0,0212
	Nisin	32,35 \pm 0,95 ^A	19,02 \pm 0,15 ^{ACD}	0,9832	0,0201
	Garvisin KS	32,40 \pm 0,53 ^A	25,81 \pm 1,81 ^{ABD}	0,9821	0,0180
	Nisin & Garvisin KS	36,49 \pm 3,42 ^A	21,17 \pm 1,32 ^{BCD}	0,9955	0,0129
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212					
	Kontroll	21,01 \pm 0,70 ^{BCD}	10,07 \pm 1,59	0,9851	0,0217
	Nisin	34,54 \pm 2,00 ^{AC}	10,77 \pm 1,10	0,9950	0,0160
	Garvisin KS	29,25 \pm 0,54 ^{ABD}	14,61 \pm 2,84	0,9906	0,0236
	Nisin & Garvisin KS	37,61 \pm 0,47 ^{AC}	13,85 \pm 0,62	0,9908	0,0232
<i>L. innocua</i> ATCC 33090					
	Kontroll	21,67 \pm 0,09 ^{BCD}	9,83 \pm 0,11 ^{CD}	0,9971	0,0171
	Nisin	28,28 \pm 0,28 ^{AC}	9,60 \pm 0,63 ^{CD}	0,9991	0,0113
	Garvisin KS	24,12 \pm 0,72 ^{ABD}	12,06 \pm 0,39 ^{ABD}	0,9986	0,0128
	Nisin & Garvisin KS	28,02 \pm 0,48 ^{AC}	11,10 \pm 0,18 ^{ABC}	0,9972	0,0172
<i>L. innocua</i> CCUG 35613					
	Kontroll	21,59 \pm 0,04 ^{BCD}	9,88 \pm 0,02 ^{BCD}	0,9947	0,0230
	Nisin	29,03 \pm 0,08 ^{ACD}	9,30 \pm 0,11 ^{ACD}	0,9994	0,0087
	Garvisin KS	24,97 \pm 0,11 ^{ABD}	11,31 \pm 0,16 ^{ABD}	0,9976	0,0118
	Nisin & Garvisin KS	27,74 \pm 0,22 ^{ABC}	10,35 \pm 0,15 ^{ABC}	0,9996	0,0057
<i>S. aureus</i> ATCC 33862					
	Kontroll	25,62 \pm 2,73 ^{BCD}	30,03 \pm 7,01	0,9947	0,0230
	Nisin	38,96 \pm 0,51 ^{AC}	25,85 \pm 2,56	0,9994	0,0087
	Garvisin KS	33,20 \pm 3,79 ^{ABD}	25,46 \pm 6,55	0,9976	0,0118
	Nisin & Garvisin KS	40,97 \pm 0,79 ^{AC}	23,68 \pm 0,58	0,9996	0,0057

En bokstav som fotnote betyr at samme kolonne er signifikant like på en 95% konfidens intervall. A: Kontroll, B: Nisin, C: Garvisin KS og D: Nisin + GarKS. (signifikant forskjell hvis ($P \leq 0,05$))

*ANOVA for λ til *B. cereus* CCUG 10781, *C. maltaromanticum*, *B. weihenstephanensis* og *E. faecalis* ble utført med ANOVA on ranks, ANOVA for μ til *B. cereus* 144 var ANOVA on ranks, og ANOVA for til *B. pumilus* ble utført med log transformert data. Dette ble gjort for å oppnå normalfordeling av restene.

n/a betyr at det var ingen vekst i perioden som ble målt. Resultatet til disse blir satt til antall timer forsøket pågikk (118 t). Dette er markert med **fet skrift.

3.1.5 *B. subtilis* PS533

Fra Tabell 3 ser vi at det er Kontroll som har kortest gjennomsnittlig lag tid (23,6 t) og satt opp mot GarKS (23,9 t) er det ingen signifikant forskjell ($p \leq 0,542$) mellom disse. Begge disse behandlingene er derimot signifikant kortere ($p < 0,001$) enn Nisin+GarKS (30,1 t), og alle disse tre er signifikant kortere ($P < 0,001$) enn Nisin (32,5 t). Ser vi derimot på gjennomsnittet til μ er det Kontrollen ($\mu = 25,3$) som er

lengst, og denne er signifikant lengre enn Nisin ($\mu = 23,9$) ($p \leq 0,006$), GarKS ($\mu = 23,3$) ($p < 0,001$) og Nisin+GarKS (23,8) ($p \leq 0,006$). Mellom Nisin, GarKS og Nisin+GarKS er det ingen signifikante forskjeller. Ser ingen synergisk effekt fra Nisin+GarKS, og en dårligere inhibering av å tilsette GarKS istedenfor Nisin. En liten antagonistisk effekt.

3.1.6 *B. pumilus* B367

Kontrollens lag tid (20,4 t) var signifikant kortere ($p < 0,001$) enn de andre behandlingsgruppene, Nisin (36,3 t) er signifikant lengre ($p < 0,001$) enn GarKS (30,2 t) og Nisin+GarKS (33,9 t), og til slutt er lag tiden til GarKS signifikant kortere ($p < 0,001$) enn lag tiden til Nisin+GarKS

Når vi ser på ANOVA statistikken til *B. pumilus* for μ derimot er det bare signifikante forskjeller mellom GarKS ($\mu = 17,2$) mot Kontroll ($\mu = 10,4$) der Kontroll er signifikant kortere ($p \leq 0,018$) og mellom GarKS mot Nisin ($\mu = 10,6$) der Nisin er signifikant kortere ($p \leq 0,019$). Mellom resten av behandlingene er det ingen signifikante forskjeller.

3.1.7 *B. weihenstephanensis* 539

Utførte en T-test. Det var ingen vekst for Nisin og Nisin+GarKS, så disse er signifikant lengre enn både Kontroll (19,3 t) og GarKS (24,3 t). På T-testen mellom Kontroll mot GarKS fikk vi at Kontroll var signifikant kortere enn GarKS ($p \leq 0,003$),

Når signifikansen for μ skal regnes ut var de 2 parallellene for Nisin og Nisin+GarKS der det ikke var noe vekst fjernet. Resultatet hentet fra Tabell 3 er viste en gjennomsnittlig μ for Kontroll på $\mu = 11,6$ og GarKS på $\mu = 16,5$. Det ingen signifikante forskjeller mellom disse behandlingene.

3.1.8 *C. inhibens*

Det er ingen vekst i noen av behandlingene der det har blitt tilsatt bakteriosiner som vi ser i Tabell 3. I kontrollen derimot er det vekst, så vi ser at alle 3 behandlingsmetodene med bakteriosiner er meget effektive.

3.1.9 *C. maltaromanticum*

Gjennomsnittsverdiene for lag tiden til *C. maltaromanticum* i Tabell 3 var: Kontroll (21,4 t) som var signifikant kortere ($p \leq 0,024$) enn Nisin+GarKS (36,5 t). Dette var ifølge Tukey-testen den eneste signifikante forskjellen for lag tid mellom behandlingene. Utenom disse hadde Nisin en lagtid på

32,35 t og GarKS en lagtid på 32,40 t. T-test utført for å verifisere dette: Det var en signifikant forskjell mellom disse også, der både Nisin og GarKS var signifikant lengre ($p < 0,001$) enn Kontroll. Gjennomsnittlig μ i Tabell 3 og ANOVA resultatene til disse viste at det var signifikante forskjeller mellom alle behandlingsgruppene ($p < 0,05$). Kontroll ($\mu = 15,7$) var den som var signifikant kortest, og GarKS ($\mu = 25,8$) den som var signifikant lengst. I midten hadde vi Nis ($\mu = 19,0$) og Nisin+GarKS ($\mu = 21,2$), hvor Nisin var signifikant kortere ($p \leq 0,048$) enn Nisin+GarKS. Antagonistisk effekt for μ i forhold til bare GarKS.

3.1.10 *E. faecalis* (ATCC 29212)

For lag tiden var det en signifikant forskjell mellom Nisin+GarKS mot Kontroll der lag tiden ble signifikant lengre ($p \leq 0,028$). Mellom resten av testene var det ingen signifikante forskjeller.

Det var ingen signifikante forskjeller mellom gjennomsnittsverdiene til μ .

Utført T-test for lag tid: Kontroll (21,0 t) er signifikant kortere enn (Nisin 34,5 t) ($p \leq 0,004$), GarKS (29,3 t) ($p < 0,001$) og Nisin+GarKS (37,6 t) ($p < 0,001$). GarKS var signifikant kortere enn både Nisin ($p \leq 0,044$) og Nisin+GarKS ($p < 0,001$), mens det var ingen signifikante forskjeller mellom disse to.

3.1.11 *L. innocua* ATCC 33090:

Lagtidene som ble hentet fra Tabell 3 viser at Kontroll har kortest (21,7 t), GarKS har litt lengre (24,1 t), Nisin+GarKS (28,0 t) og til slutt Nisin (28,3 t) med lengst lag tid. Av disse er det signifikante forskjeller ($p < 0,001$) mellom alle behandlingene utenom mellom Nisin og Nisin+GarKS ($p \leq 0,511$). For μ var verdiene: Kontroll ($\mu = 9,8$), Nisin ($\mu = 9,6$), GarKS ($\mu = 12,1$) og Nisin+GarKS ($\mu = 11,1$). Mellom Nisin og Kontrollen er det ingen signifikante forskjeller. GarKS er signifikant lengre enn Nisin ($p < 0,001$), Kontroll ($p < 0,001$) og Nisin+GarKS ($p \leq 0,031$). Til slutt er også Nisin+GarKS signifikant lengre enn Kontroll ($p \leq 0,011$) og Nisin ($p \leq 0,006$).

Vi ser en synergi mellom Nisin og GarKS her. For lag tid har behandlingen som er tilsatt begge bakteriosinene ca. like lang lag tid som Nisin og en signifikant lengre ($p < 0,001$) lag tid enn GarKS. For μ derimot er den ca. like lang som GarKS og signifikant lengre ($p \leq 0,006$) enn Nisin. Dette viser at den har litt av inhiberingsegenskapene til hver av bakteriosinene mot *L. innocua*.

3.1.12 *L. innocua* CCUG 35613:

Fra Tabell 3 får vi gjennomsnittlig lag tiden der vi ser at Kontrollen (21,6 t) er signifikant mindre enn ($p < 0,001$) Nisin (29,0 t), GarKS (25,0 t) og Nisin+GarKS (27,7 t). Videre ser vi at GarKS er signifikant kortere ($p < 0,001$) enn både Nisin og Nisin+GarKS. Til slutt ser vi at Nisin er signifikant

lengre ($p < 0,001$) enn Nisin+GarKS. For gjennomsnittlig μ er Nis ($\mu = 9,3$) kortest og signifikant kortere ($p < 0,001$) enn Kontroll ($\mu = 9,9$), GarKS ($\mu = 11,3$) og Nisin+GarKS ($\mu = 10,3$). Kontroll er signifikant kortere enn Nisin+GarKS ($p \leq 0,002$) og GarKS ($p < 0,001$), og GarKS signifikant lengre ($p < 0,001$) enn Nisin+GarKS. Resultatene her ligner ganske mye på den andre *L. innocua* stammen vi har der vi også ser synergi mellom Nisin og GarKS. Resultatene mellom disse to stammene var ganske like da de ble forsket på i Saha A et al. 2017.

3.1.13 *S. aureus* ATCC 33862:

Kontroll har kortest gjennomsnittlig lagtid (25,6 t) og er signifikant kortere ($p \leq 0,014$) enn GarKS (33,2 t), og signifikant kortere ($p < 0,001$) enn Nisin (39,0 t) og Nisin+GarKS (41,0 t). Nisin i gjengjeld er signifikant lengre ($p \leq 0,036$) enn GarKS, men ikke signifikant forskjellig fra Nisin+GarKS, mens GarKS er signifikant kortere ($p \leq 0,016$) enn Nisin+GarKS. Det er ingen signifikante forskjeller mellom de forskjellige behandlingene når det kommer til μ .

3.2 Eksperiment 2 (Synergy 10°C):

3.2.1 *B. cereus* 144:

Ut ifra Tabell 4 er det signifikante forskjeller mellom Kontrollen mot GarKS ($p < 0,001$), Kontrollen mot Nisin+GarKS ($p \leq 0,010$) og Nisin mot GarKS ($p \leq 0,005$) fordi $p < 0,05$ for disse. Det er derimot ingen signifikante forskjeller mellom Nisin+GarKS mot Nisin ($p \leq 0,054$) eller GarKS ($p \leq 0,138$), og Kontroll mot Nisin ($p \leq 0,203$). Det er GarKS som har kortest lag tid (79,0 t), mens Kontrollen hadde lengst lag tid (125,6 t). Nisin hadde nest lengst (115,5 t) og Nisin+GarKS tredje lengst (94,1 t) (Tabell 4). Kontrollen hadde en gjennomsnittlig $\mu = 72,7$ som var den korteste av behandlingene, Nisin ($\mu = 128,3$) og GarKS ($\mu = 123,6$) hadde ganske lik vekstrate og Nisin+GarKS hadde den lengste vekstraten med $\mu = 181,2$. Av disse behandlingene var det bare Nisin mot GarKS som ikke var signifikant forskjellige ($p \leq 0,779$). Nisin+GarKS er signifikant lengre enn Kontroll ($p < 0,001$), Nisin ($p \leq 0,035$), og GarKS ($p \leq 0,037$). Kontroll er signifikant kortere enn Nisin ($p \leq 0,036$) og GarKS ($p \leq 0,028$). Vi ser en antagonistisk effekt av GarKS.

Tabell 4: Gjennomsnitt av 3 paralleller \pm standardavvik (SD) for λ og μ hentet fra kurvetilpasset Weibull data eksperiment 2.

Bakterieart	Behandling	λ (i timer) \pm SD	$\mu \pm$ SD	R ²	SSE
<i>B. cereus</i> 144	Kontroll	125,62 \pm 10,92 ^{CD}	72,69 \pm 18,54 ^{BCD}	0,9981	0,0095
	Nisin	115,54 \pm 10,94 ^C	128,32 \pm 15,26 ^{AD}	0,9933	0,0053
	Garvisin KS	79,00 \pm 1,21 ^{AB}	123,61 \pm 17,63 ^{AD}	0,9964	0,0026
	Nisin & Garvisin KS	94,08 \pm 8,73 ^A	181,24 \pm 26,50 ^{ABC}	0,9947	0,0056
<i>B. cereus</i> CCUG 10781	Kontroll	n/a	--	--	--
	Nisin	n/a	--	--	--
	Garvisin KS	n/a	--	--	--
	Nisin & Garvisin KS	n/a	--	--	--
<i>B. subtilis</i> PS533	Kontroll	n/a	--	--	--
	Nisin	n/a	--	--	--
	Garvisin KS	n/a	--	--	--
	Nisin & Garvisin KS	n/a	--	--	--
<i>B. weihenstephanensis</i> 539	Kontroll	95,07 \pm 4,44 ^{BCD}	44,17 \pm 6,49	0,9986	0,002
	Nisin	309,9^{AC}	--	--	--
	Garvisin KS	54,54 \pm 5,06 ^{ABD}	62,93 \pm 28,32	0,9907	0,0041
	Nisin & Garvisin KS	309,9^{AC}	--	--	--
<i>C. maltaromaticum</i> CCUG 30142T	Kontroll	65,60 \pm 1,83 ^{BD}	55,71 \pm 21,81	0,9999	0,0021
	Nisin	76,54 \pm 2,43 ^{ACD}	42,54 \pm 1,47	0,9998	0,0038
	Garvisin KS	63,56 \pm 2,34 ^{BD}	61,89 \pm 31,06	0,9987	0,0158
	Nisin & Garvisin KS	82,32 \pm 0,73 ^{ABC}	35,29 \pm 6,31	0,9991	0,0057
<i>L. innocua</i> ATCC 33090*	Kontroll	100,78 \pm 0,77 ^{BD}	48,16 \pm 3,10 ^B	0,9998	0,0034
	Nisin	121,89 \pm 1,10 ^{AC}	38,83 \pm 2,16 ^A	0,9983	0,009
	Garvisin KS	100,94 \pm 6,71 ^{BD}	48,85 \pm 11,59	0,9990	0,0085
	Nisin & Garvisin KS	120,96 \pm 2,51 ^{AC}	46,81 \pm 5,15	0,9984	0,0088
<i>S. aureus</i> ATCC 33862	Kontroll	n/a	--	--	--
	Nisin	n/a	--	--	--
	Garvisin KS	n/a	--	--	--
	Nisin & Garvisin KS	n/a	--	--	--

En bokstav som fotnote betyr at samme kolonne er signifikant like på en 95% konfidensintervall. A: Kontroll, B: Nisin, C: Garvisin og D: Nisin + GarKS.

*ANOVA for λ til *L. innocua* ble utført med ANOVA on ranks for å oppnå normalfordeling av restene.

n/a betyr at det var ingen vekst i perioden som ble målt. Resultatet til disse blir satt til 309,9 t. Dette er markert med **fet skrift.

3.2.2 *B. cereus* CCUG 10781

På 10°C var det ingen merkbar vekst for *B. cereus* CCUG 10781 for noen av behandlingene i løpet av de 167 timene forsøket pågikk (Tabell 4). Det var antatt at denne var psykrotrof, men dette kan antyde at den ikke var det av likevel.

3.2.3 *B. subtilis* PS533

Fra Tabell 4 ser vi at det er ingen vekst i noen av behandlingene til *B. subtilis* i løpet av perioden forsøket pågikk. Temperaturen for denne akkurat denne stammen skal være spesifikk, og den er dokumentert til å kunne vokse ved 5.5°C (Se Tabell 1 for temperatur), men kanskje dette er under andre betingelser. Det var LB medium som ble brukt i Ghosh S and Setlow P, 2009. Mikrotiterplaten lå i kjøleskap ved 10°C med lukket lokk så den hadde kanskje dårlig luft. Eller så kan det ha blitt anoksisk pga lite risting/lav intensitet på ristingen.

3.2.4 *B. weihenstephanensis* 539

Det er ingen vekst i behandlingene med Nisin og Nisin+GarKS, så disse er signifikant lengre enn Kontroll og GarKS, men har ingen signifikante forskjeller mellom seg. I behandlingene med GarKS (54,5 t) mot Kontroll (95,1 t) viser statistikken at GarKS er signifikant kortere ($p < 0,001$). For μ mellom GarKS og Kontroll er det ingen signifikante forskjeller.

3.2.5 *C. maltaromanticum*

Ingen signifikante forskjeller mellom GarKS (63,6 t) mot Kontroll (65,6 t) ($p \leq 0,236$). Men det er signifikante forskjeller ($p < 0,001$) mellom disse mot Nisin (76,5 t) og mot Nisin+GarKS (82,3 t) der både Kontroll og GarKS er signifikant kortere enn dem. I tillegg til dette er Nisin signifikant kortere ($p \leq 0,014$) enn Nisin+GarKS. Dette er tegn på en synergi mellom Nisin og GarKS.

Det er svært lite sannsynlighet for å finne signifikante forskjeller mellom μ til behandlingene fordi det er så store standardavvik mellom gjennomsnittene dem. Det betyr ikke at det ikke er noe, men bare at det er vanskelig å finne dem.

3.2.6 *L. innocua* ATCC 33090:

Fra ANOVA fikk vi at det ikke var noen signifikante forskjeller i lag tidene: Kontroll (100,8 t), Nisin (121,9 t), GarKS (100,9 t) og Nisin+GarKS (121,0 t). T-testen derimot viste at Kontroll og GarKS var begge signifikant kortere ($p < 0,001$) enn både Nisin og Nisin+GarKS, men ingen signifikante forskjeller mellom Kontroll og GarKS, og mellom Nisin og Nisin+GarKS.

Gjennomsnittlig μ er: Kontroll ($\mu = 48,2$), Nisin ($\mu = 38,8$), GarKS ($\mu = 48,8$) og Nisin+GarKS ($\mu = 46,8$). Det var ingen signifikante forskjeller mellom behandlingsmetodene ved 10°C.

3.2.7 *S. aureus* ATCC 33862:

Det ble ingen vekst av *S. aureus* i den perioden målingene ble tatt på 10°C. Har derfor ingen resultater fra dette. Det har blitt rapportert at noen stammer av *S. aureus* kan vokse helt ned til 7°C. Dette er tydeligvis stammevariasjoner eller så trenger denne stammen å adapteres til temperaturen før den kan vokse.

3.3 Eksperiment 3 (Synergy 5°C):

Det vekst i blanken før det ble vekst i en del av de andre behandlingene da vi gjorde dette forsøket. Dette skjedde litt ut i målingene, så det var verken vits i å fortsette, eller tid til å gjøre eksperimentet på nytt.

3.4 Eksperiment 4 (Checkerboard analyse 20°C):

3.4.1 *B. cereus* 144:

N0/G2 (Hvor N står for Nisin og G for GarKS, og tallet bak bokstaven antall $\mu\text{g/mL}$ bakteriosin det er tilsatt): har en gjennomsnittlig lagtid på 17,0 t, N0.5/G1.5 på 15,8 t, N1/G1 på 17,9 t, N1.5/G0.5 20,3 t, N2/G0 168,0 t og N0/G0 på 13,8 t. I følge Tukey-Testen som ble utført er det bare en signifikant forskjell mellom N2/G0 og N0/G0 ($p \leq 0,008$). Mellom resten av behandlingene var det ingen signifikante forskjeller. Alle vekstratene var også veldig nær hverandre i verdi og det viste det var ingen signifikante forskjeller mellom dem. (Tabell 5)

T-test viste derimot at det var signifikante forskjeller mellom alle behandlingene. Rangert fra signifikant kortest til signifikant lengst lag tid: N0/G0, N0.5/G1.5, N0/G2, N1/G1, N1.5/G0.5 og

N2/G0. For μ var det N0/G0 mot N0.5/G1.5 ($p \leq 0,019$), N1/G1 ($p \leq 0,002$) og N1.5/G0.5 ($p \leq 0,031$), hvor N0/G0 var signifikant kortere i begge tilfellene.

Tabell 5: Gjennomsnitt av 3 paralleller \pm standardavvik (SD) for λ og μ hentet fra kurvetilpasset Weibull data eksperiment 2. En bokstav som fotnote betyr at samme kolonne er signifikant like på en 95% konfidensintervall. (signifikant forskjell hvis ($P \leq 0,05$))

Bakterieart	Behandling*	λ (i timer) \pm SD	$\mu \pm$ SD	R ²	SSE
<i>B. cereus</i> 144					
	A	16,96 \pm 0,19 ^{BCDEF}	11,15 \pm 0,74	0,9991	0,0109
	B	15,82 \pm 0,11 ^{ACDEF}	11,36 \pm 0,52	0,9992	0,0111
	C	17,87 \pm 0,10 ^{ABDEF}	11,22 \pm 0,09	0,9994	0,0088
	D	20,28 \pm 0,77 ^{ABCEF}	11,06 \pm 0,45	0,9993	0,0081
	E	168 ^{ABCDF}	--	--	--
	F	13,76 \pm 0,14 ^{ABCDE}	10,06 \pm 0,28	0,9992	0,0108
<i>B. licheniformis</i> NVH-B357					
	A	50,18 \pm 0,70 ^{BCDE}	41,22 \pm 1,15 ^{BCDF}	0,9986	0,007
	B	57,91 \pm 0,50 ^{ACDEF}	53,56 \pm 1,47 ^{ACDF}	0,9975	0,0079
	C	106,68 \pm 43,37 ^{ABF}	79,50 \pm 7,04 ^{ABF}	0,9942	0,0091
	D	123,91 \pm 32,98 ^{ABF}	96,47 \pm 1,17 ^{ABF}	0,9881	0,0106
	E	168 ^{ABF}	--	--	--
	F	50,42 \pm 0,23 ^{BCDE}	29,18 \pm 0,03 ^{ABCD}	0,9987	0,0077
<i>C. maltaromaticum</i> CCUG 30142T					
	A	168 ^{BCDEF}	--	--	--
	B	39,05 \pm 2,88 ^{ACF}	21,75 \pm 2,38 ^F	0,9986	0,0053
	C	34,29 \pm 0,85 ^{ABEF}	21,41 \pm 0,37 ^F	0,9986	0,0056
	D	37,04 \pm 0,65 ^{AF}	21,18 \pm 1,06 ^F	0,9989	0,0057
	E	39,49 \pm 2,38 ^{ACF}	21,77 \pm 1,19 ^F	0,9982	0,0068
	F	24,29 \pm 0,28 ^{ABCDE}	15,24 \pm 0,55 ^{BCDE}	0,9991	0,0062
<i>L. innocua</i> ATCC 33090					
	A	109,57 \pm 27,82 ^{BCDEF}	16,53 \pm 1,53 ^{CDEF}	0,9965	0,0102
	B	44,32 \pm 3,65 ^{ACDEF}	13,77 \pm 0,64 ^{CDF}	0,9981	0,011
	C	29,80 \pm 0,72 ^{ABDEF}	12,38 \pm 0,29 ^{AB}	0,9986	0,0094
	D	31,89 \pm 0,14 ^{ABCEF}	12,10 \pm 0,06 ^{ABE}	0,9985	0,0105
	E	34,20 \pm 0,47 ^{ABCDF}	13,02 \pm 0,17 ^{ADF}	0,9979	0,0155
	F	22,55 \pm 0,07 ^{ABCDE}	11,61 \pm 0,33 ^{ABE}	0,9979	0,0124
<i>S. aureus</i> ATCC 33862					
	A	37,91 \pm 0,45 ^{DEF}	20,72 \pm 0,54	0,9993	0,0121
	B	37,19 \pm 0,43 ^{DEF}	21,12 \pm 0,51	0,9992	0,0119
	C	38,55 \pm 1,21 ^{DEF}	23,14 \pm 2,82	0,9990	0,0134
	D	46,02 \pm 2,09 ^{ABCEF}	25,45 \pm 1,82	0,9986	0,0114
	E	104,42 \pm 18,10 ^{ABCDF}	27,65 \pm 3,90	0,9967	0,0167
	F	31,50 \pm 0,43 ^{ACDE}	27,51 \pm 2,81	0,9987	0,0112

*Behandlingsnavnene er hentet fra Tabell 2.

**ANOVA for λ til *B. cereus* 144, *B. licheniformis*, *C. maltaromaticum*, *L. innocua* og *S. aureus* ble utført med ANOVA on ranks, ANOVA for μ til *B. licheniformis* og *L. innocua* var ANOVA on ranks for å oppnå normalfordeling av restene.

***n/a betyr at det var ingen vekst i perioden som ble målt. Resultatet til disse blir satt til antall timer forsøket pågikk (168 t).

Dette er markert med **fet** skrift.

3.4.2 *B. licheniformis* NVH-B357

Resultatene viste at det bare var signifikant forskjell mellom N2/G0 (168 t) mot N0/G2 (50,2 t) på lag tid, der N0/G2 var signifikant kortere ($p \leq 0,034$). For μ var N1.5/G0.5 (96,5) signifikant lengre ($p \leq 0,031$) enn N0/G0 (29,2), men ingen andre behandlinger. N2/G0 hadde ingen vekst i løpet av forsøket så denne ble ikke tatt med i de statistiske utregningene for μ .

Siden flere av behandlingsparallellelene manglet 1 eller flere parametere ble det utført en T-test:

Lag tiden: N2/G0 var signifikant lengre ($p < 0,001$) enn N0/G2, N0.5/G1.5, og N0/G0. N1.5/G0.5 var signifikant lengre enn N0/G2 ($p \leq 0,034$), N0.5/G1.5 ($p \leq 0,047$) og N0/G0 ($p \leq 0,034$), men bare marginalt. Til slutt var N0.5/G1.5 var signifikante lengre ($p < 0,001$) enn N0/G2 og N0/G0.

Resultatet derifra for μ viste at N0.5/G1.5 var signifikante lengre ($p < 0,001$) enn N0/G2 og N0/G0, og signifikant kortere enn N1/G1 ($p \leq 0,017$) og N1.5/G0.5 ($p < 0,001$). I tillegg var N0/G2 signifikant kortere enn N1/G1 ($p \leq 0,005$) og N1.5/G0.5 ($p < 0,001$), men signifikant lengre ($p < 0,001$) enn N0/G0. N0/G0 var signifikant kortere enn N1/G1 ($p \leq 0,002$) og N1.5/G0.5 ($p < 0,001$). N1/G1 og N1.5/G0.5 var ikke signifikant forskjellige fra hverandre.

3.4.3 *C. maltaromanticum*

N0/G2 (168 t) var signifikant lengre ($p < 0,001$) enn alle de andre behandlingene. N0/G0 er signifikant kortere ($p < 0,001$) enn de andre. N1/G1 er signifikant kortere enn N2/G0 ($p \leq 0,010$) og N0.5/G1.5 ($p \leq 0,016$). Det er ingen signifikante forskjeller i lagtid mellom N1.5/G0.5 vs. N1/G1, N2/G0 vs. N1.5/G0.5, N0.5/G1.5 vs. N1.5/G0.5 og N2/G0 vs. N0.5/G1.5.

Ser ut til å være mer effektiv med høyere konsentrasjon av en bakteriosin enn lavere av to.

Pga ingen vekst droppes N0/G2 fra statistikken til μ . For μ er N0/G0 signifikant kortere ($p < 0,001$) enn de andre behandlingene, og mellom resten av behandlingsgruppene er det ingen signifikante forskjeller.

3.4.4 *L. innocua* ATCC 33090:

Lag tid: signifikante forskjeller mellom N0/G2 vs N0/G0, men ingen av de andre. μ : det samme gjelder her. Utførte T-test: Signifikante forskjeller for lag tid mellom alle prøvene. Av disse var N0/G2 signifikant lengre ($p \sim 0,020$) enn alle andre. N0/0 var signifikant kortere ($p < 0,001$) enn de andre. N0.5/G1.5 er signifikant lengre enn N1/G1 ($p \leq 0,005$), N1.5/G0.5 ($p \leq 0,009$) og N2/G0 ($p \leq 0,018$). N2/G0 er signifikant lengre enn N1/G1 ($p \leq 0,002$) og N1.5/G0.5 ($p \leq 0,003$), mens N1/G1 er signifikant kortere ($p \leq 0,016$) enn N1.5/G0.5.

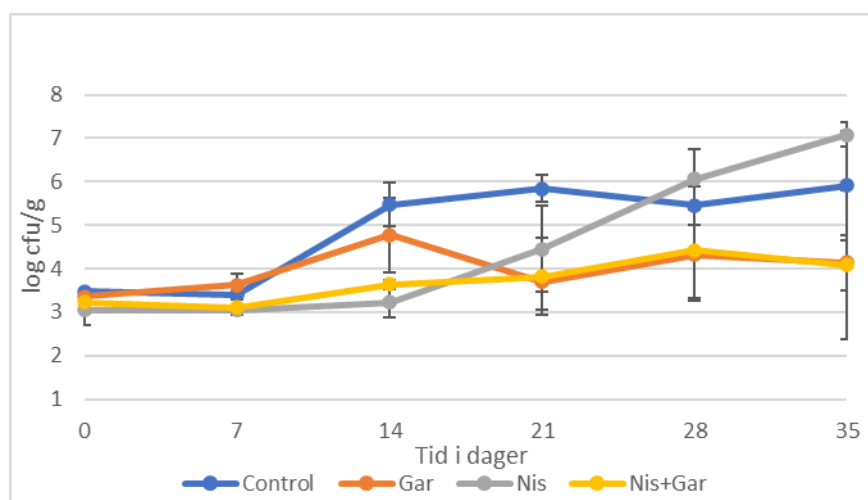
μ : N0/G2 er signifikant lengre enn N1/G1 ($p \leq 0,020$), N1.5/G0.5 ($p \leq 0,015$), N2/G0 ($p \leq 0,033$) og N0/G0 ($p \leq 0,011$). N0.5/G1.5 er signifikant lengre enn N1/G1 ($p \leq 0,049$), N1.5/G0.5 ($p \leq 0,021$) og N0/G0 (0,013). N2/G0 er signifikant lengre enn N1.5/G0.5 ($p \leq 0,003$) og N0/G0 ($p \leq 0,005$).

3.4.5 *S. aureus*

ANOVA resultatene viser at N2/G0 har signifikant lengre ($p \leq 0,008$) lag tid enn N0/G0, men ikke mellom noen av de andre behandlingene. For μ derimot er det ingen signifikante forskjeller mellom noen av stoffene. T-test lag tid: N2/G0 er signifikant lengre enn N0/G2 ($p \leq 0,007$), N0.5/G1.5 ($p \leq 0,006$), N1/G1 ($p \leq 0,007$), N1.5/G0.5 ($p \leq 0,011$) og N0/G0 ($p \leq 0,005$). N1.5/G0.5 er signifikant lengre enn N0/G2 ($p \leq 0,006$), N0.5/G1.5 ($p \leq 0,004$), N1/G1 ($p \leq 0,012$) og N0/G0 ($p < 0,001$). Til slutt er N0/G0 signifikant kortere ($p < 0,001$) enn N1/G1 og N0/G2.

3.5 Eksperiment 5 (Challenge forsøk):

Ingen av bakgrunnsfloraene som ble gjort viste tegn til å være kontaminerte med *Listeria spp.* Mellom dag 7 og 14 vokste Kontroll med ca. log 2 cfu/g. Etter dag 14 holdt den seg ganske stabilt (log 5-6 cfu/g). Nisin holdt seg ganske lav fram til og med dag 14, men begynte å vokse litt og litt (ca. log 1,5 cfu/g) mellom hver måling etter det, og hadde høyest konsentrasjon ved dag 28 av alle behandlingsmåtene. Som vi ser i Figur 1 starta CSS bitene som var behandla med GarKS med noe høyere bakteriekonsentrasjoner. Dette varte fram til uttak nummer 3 (dag 14), hvor den starta å gå ned og holdt seg relativt lavt resten av målingene. Behandlingen som hadde Nisin+GarKS holdt seg ganske lavt hele veien ved å vokse ca. 1 log cfu/g i løpet av 6 uker. Vi ser synergien mellom Nisin og GarKS her. Der den har inhiberingen til begge.



Figur 1: Resultater fra behandlingene av CSS der konsentrasjonen av bakterier er satt opp mot antall dager. x-akse: Antall dager, y-akse: log cfu/g med bakterie.

Temperaturen i kjøleskap opp vedd 7-8°C fram til ca. dag 14. Var mye opp og ned den perioden. Kan ha ført til all ekstra vekst i GarKS fram til dag 14. Det kan hende GarKS er mer sensitiv til temperatur svingninger enn det nisin er, eller at GarKS er bedre ved lavere temperatur enn det nisin er. Kunne vært greit å gjenta for å bekrefte om temperaturendringen hadde så mye å si. Den antimikrobielle aktiviteten til GarKS er blitt funnet å være varmestabil ifølge Ovchinnikov et al. 2016, men om det gjelder ved temperatur mellom 4-8°C også fant jeg ikke.

3.5.1 Dosering i forhold til regelverket

Tillatt maksimalt mengde er 25 mg/kg nisin i varmebehandlet kjøtt (ikke fisk) og 12 mg/kg nisin i ost (noen typer) (Younes M et al., 2016). I forsøkeene ble det brukt Nisin som tilsvarer 2 mg/kg CSS (aktiv reagens). Dette er lavere enn det som er tillatt å bruke.

Ut ifra hva som allerede er lov i forhold til konsumering av mennesker med tanke på toksikologi, så ser vi at vi har mer å gå på. Antar at GarKS trolig har en lignende toksikologi som Nisin, fordi begge kommer opprinnelig fra melkesyre bakterier som generelt sett blir sett på som trygge (O'Sullivan L, 2002). Det kan derfor gjøres Challenge forsøk på CSS med GarKS der konsentrasjonene her høyere for å sjekke hvordan effekten påvirkes av det.

Bacillus

Vi ser at for bakterier i slekten *Bacillus* har GarKS som regel dårligere eller lik effekt enn det Nisin har for både μ og lag tid. Når disse to bakteriosinene er tilsatt sammen ser vi mer antagonistiske effekter enn for når Nisin er alene. Vi ser også unntak til dette i *B. cereus* 144, μ for *B. licheniformis* NVH1032 (antagonisme ved lag tid) og lag tid til *B. weihenstephanensis* der lag tiden ikke blir negativt påvirket.

Ved 10°C var det ingen påvirkning for lag tiden til *B. weihenstephanensis* av å ha begge bakteriosinene opp mot å bare ha Nisin, men å bare ha GarKS gir dårligere lag tid enn disse i tillegg til dårligere lag tid enn Kontroll. For *B. cereus* 144 ble lag tiden kortere ved å tilsette GarKS og Nisin+GarKS i forhold til Kontroll og Nisin. For μ derimot så vi at både Nisin og GarKS ga signifikant lengre μ og i tillegg til dette så vi en synergi mellom Nisin+GarKS.

Fra dataene vi har fått fra Checkerboard analyse ser vi at effekten fra høyere konsentrasjon Nisin er bedre enn når konsentrasjonen til GarKS er høyere, og den best beste hemningen får vi når Nisin er alene.

3.6 METODEEVALUERING

Høy R^2 og lav standardavvik viser oss at disse Weibull-modellene vi har brukt for BioScreen C og Synergy begge er ganske gode. Selv om Synergy dataene hadde mange færre målinger var modellene fine. Vi hadde generelt veldig få paralleller, så ANOVA resultatene til noen av behandlingene var ikke av like bra sikkerhet. Det ble derfor gjort T-tester i flere av tilfelle hvor ANOVA on ranks ble brukt. Temperaturen i kjøleskapet CSS fra eksperiment 5 var også litt høyere (7-8°C) enn ønsket. Men dette var bare tilfellet de første 14 dagene. Basert på eksperiment 5 ser det ut til at GarKS er enda bedre ved lavere temperatur (~4°C).

Vi har fra disse forsøkene sett bra effekt av Garvisin KS mot noen av bakteriene vi har testet. Jeg føler at den ga bra nok effekt mot *L. innocua* når vi testet det på CSS. Dette stemmer i forhold til upublisert resultater fra behandling av *L. monocytogenes* (pers. komm. Løvdal T). Tenker dette bør gjentas med forskjellige konsentrasjoner av Garvisin KS. Både høyere og lavere konsentrasjoner.

3.6.1 Resultater ved 10°C

Var mange av bakteriestammene som vi forventet vekst på som ikke vokste i dette forsøket. Spesielt *B. subtilis* PS533 som tidligere har blitt dokumentert til å vokse ved 5.5°C. Hele dette forsøket bør gjentas for å bekrefte om resultatene her stemte eller det om det var andre feilkilder, som gjorde at vi fikk avvikende resultater i andre stammer enn bare *B. subtilis* PS533.

4. KONKLUSJON

Nisin virker mer umiddelbart og starter hemmingen med en gang den tilsettes (derfor lengre lag tid) mens GarKS ser ut til å bruke litt tid til å adaptere seg, men har derimot lengre μ enn nisin og virker over lengre tid. Effekten til GarKS var ganske dårlig ved 10°C i de testene som ble gjort

Bruk av GarKS som behandling mot *Bacillus* gir som regel dårligere resultater enn nisin. Det er selv bedre å ha nisin alene, enn å ha begge bakteriosinene. 1 μ g/mL aktiv reagens av nisin hemmet *Bacillus* mer enn det 2 μ g/mL GarKS gjorde. Bør gjenta ett forsøk i lavere temperatur med flere psykrotrofe *Bacillus* stammer for å sjekke om resultatene er reproducerbare.

Det ser ut til å være synergi mellom Nisin og GarKS mot mange av slektene vi gjorde forsøk på, noe som stemmer med tidligere publiserte dataer (Chi H og Holo H, 2018).

Resultatene fra checkerboard analysen at det oppnås bedre hemming av å ha en litt høyere konsentrasjon av det ene bakteriosinet enn synergien gir ved 20°C. GarKS og kombinasjon av GarKS

og Nisin gir gode resultater for hemming av lag tiden til bakterier av denne slekten. Dette ser vi fra dataene i forsøk 1, 2 og 4, men det beste resultatet kommer når vi har 2 µg/mL GarKS som behandlingen. Å ha forsøk med høyere konsentrasjoner kan være lurt for å sjekke om det er bedre med bare GarKS enn å ha bare Nisin eller både GarKS og Nisin.

GarKS viser bedre resultater mot *L. innocua* enn det nisin gjør. Dette er positivt for bekjempelse av andre *Listeria* stammer som har lignende egenskaper.

5. Kilder

1. Afzal MI, Jacquet T, Delaunay S, Borges F, Millière JB, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C. *Carnobacterium maltaromaticum*: identification, isolation tools, ecology and technological aspects in dairy products. *Food Microbiol.* 2010 Aug;27(5):573-9. doi: 10.1016/j.fm.2010.03.019. Epub 2010 Apr 8. PMID: 20510773.
2. Borch-Pedersen K, Mellegård H, Reineke K, et al. Effects of High Pressure on *Bacillus licheniformis* Spore Germination and Inactivation [published correction appears in *Appl Environ Microbiol.* 2017 Nov 16;83(23)]. *Appl Environ Microbiol.* 2017;83(14):e00503-17. Published 2017 Jun 30. doi:10.1128/AEM.00503-17
3. Chi H, Holo H. Synergistic Antimicrobial Activity Between the Broad Spectrum Bacteriocin Garvicin KS and Nisin, Farnesol and Polymyxin B Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Curr Microbiol.* 2018;75(3):272-277. doi:10.1007/s00284-017-1375-y
4. Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int J Food Microbiol.* 2001 Dec 4;71(1):1-20. doi: 10.1016/s0168-1605(01)00560-8. PMID: 11764886.
5. EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS), Younes, M, Aggett, P, Aguilar, F, Crebelli, R, Dusemund, B, Filipič, M, Frutos, MJ, Galtier, P, Gundert-Remy, U, Kuhnle, GG, Lambré, C, Leblanc, J-C, Lillegaard, IT, Moldeus, P, Mortensen, A, Oskarsson, A, Stankovic, I, Waalkens-Berendsen, I, Woutersen, RA, Wright, M, Herman, L, Tobback, P, Pizzo, F, Smeraldi, C, Tard, A, Papaioannou, A and Gott, D, 2017. Scientific Opinion on the safety of nisin (E 234) as a food additive in the light of new toxicological data and the proposed extension of use. *EFSA Journal* 2017;15(12):5063, 16 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5063>
6. Ehling-Schulz M, Svensson B, Guinebretiere MH, Lindbäck T, Andersson M, Schulz A, Fricker M, Christiansson A, Granum PE, Märtilbauer E, Nguyen-The C, Salkinoja-Salonen M, Scherer S. Emetic toxin formation of *Bacillus cereus* is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains. *Microbiology (Reading).* 2005 Jan;151(Pt 1):183-197. doi: 10.1099/mic.0.27607-0. PMID: 15632437.
7. From C, Hormazabal V, Granum PE. Food poisoning associated with pumilacidin-producing *Bacillus pumilus* in rice. *Int J Food Microbiol.* 2007 Apr 20;115(3):319-24. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2006.11.005. Epub 2007 Jan 13. PMID: 17275116.
8. Gauvry E, Mathot AG, Couvert O, Leguérinel I, Coroller L. Effects of temperature, pH and water activity on the growth and the sporulation abilities of *Bacillus subtilis* BSB1. *Int J Food Microbiol.* 2021 Jan 16;337:108915. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108915. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33152569.

9. Ghosh S, Setlow P. Isolation and characterization of superdormant spores of *Bacillus* species. *J Bacteriol.* 2009;191(6):1787-1797. doi:10.1128/JB.01668-08
10. Jöborn A, Dorsch M, Olsson JC, Westerdahl A, Kjelleberg S. *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Int J Syst Bacteriol.* 1999 Oct;49 Pt 4:1891-8. doi: 10.1099/00207713-49-4-1891. PMID: 10555373.
11. Kjos M, Borrero J, Opsata M, Birri DJ, Holo H, Cintas LM, Snipen L, Hernandez PE, Nes IF, Diep DB. 2011. Target recognition, resistance, immunity and genome mining of class II bacteriocins from Gram-positive bacteria. *Microbiology* 157:3256–3267.
12. Laursen BG, Bay L, Cleenwerck I, Vancanneyt M, Swings J, Dalgaard P, Leisner JJ. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. *Syst Appl Microbiol.* 2005 Mar;28(2):151-64. doi: 10.1016/j.syapm.2004.12.001. PMID: 15830808.
13. Lechner S, Mayr R, Francis KP, Prüss BM, Kaplan T, Wiessner-Gunkel E, Stewart GS, Scherer S. *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *Int J Syst Bacteriol.* 1998 Oct;48 Pt 4:1373-82. doi: 10.1099/00207713-48-4-1373. PMID: 9828439.
14. Logan, N.A. and De Vos, P. (2009) Genus I. *Bacillus* Cohn 1872, 174AL. In: De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, W.B., Eds., *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd Edition, Springer, New York, 3, 21-128.
15. Lotte P Stenfors, Ralf Mayr, Siegfried Scherer, Per Einar Granum, Pathogenic potential of fifty *Bacillus weihenstephanensis* strains, *FEMS Microbiology Letters*, Volume 215, Issue 1, September 2002, Pages 47–51, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11368.x>
16. Milillo SR, Friedly EC, Saldivar JC, Muthaiyan A, O'Bryan C, Crandall PG, Johnson MG, Ricke SC. A review of the ecology, genomics, and stress response of *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes*. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012;52(8):712-25. doi: 10.1080/10408398.2010.507909. PMID: 22591342.
17. Mohan V, Wibisono R, de Hoop L, Summers G, Fletcher GC. Identifying Suitable *Listeria innocua* Strains as Surrogates for *Listeria monocytogenes* for Horticultural Products. *Front Microbiol.* 2019;10:2281. Published 2019 Oct 9. doi:10.3389/fmicb.2019.02281
18. O'Sullivan L, Ross RP, Hill C. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie.* 2002;84(5-6):593-604. doi:10.1016/s0300-9084(02)01457-8
19. Ovchinnikov KV, Chi H, Mehmeti I, Holo H, Nes IF, Diep DB. Novel Group of Leaderless Multi-peptide Bacteriocins from Gram-Positive Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2016 Aug 15;82(17):5216-24. doi: 10.1128/AEM.01094-16. PMID: 27316965; PMCID: PMC4988205.

20. Ramaswamy V, Cresence VM, Rejitha JS, Lekshmi MU, Dharsana KS, Prasad SP, Vijila HM. Listeria--review of epidemiology and pathogenesis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2007 Feb;40(1):4-13. PMID: 17332901.
21. Samapundo S, Heyndrickx M, Xhaferi R, de Baenst I, Devlieghere F. The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of *Bacillus cereus* and *Bacillus pumilus* in artificial media and food products. *Int J Food Microbiol.* 2014 Jul 2;181:10-8. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.018. Epub 2014 Apr 21. PMID: 24801270.
22. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006 Feb;32(2):93-8. doi: 10.1016/j.joen.2005.10.049. PMID: 16427453.
23. Thapa RK, Winther-Larsen HC, Diep DB, Tønnesen HH. Preformulation studies on novel garvicin KS peptides for topical applications. *Eur J Pharm Sci.* 2020 Aug 1;151:105333. doi: 10.1016/j.ejps.2020.105333. Epub 2020 Apr 5. PMID: 32268197.
24. Trunet C, Mtimet N, Mathot AG, et al. Modeling the recovery of heat-treated *Bacillus licheniformis* Ad978 and *Bacillus weihenstephanensis* KBAB4 spores at suboptimal temperature and pH using growth limits. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(2):562-568. doi:10.1128/AEM.02520-14
25. U.S. Food and Drug Administration. Bacteriological Analytical Manual; ASSociation of Official Analytical Chemists: Washington DC, USA, 1998
26. U.S. FDA, Microorganisms & Microbial-Derived Ingredients Used in Food (Partial List), 2018, Hentet fra <https://www.fda.gov/food/generally-recognized-safe-gras/microorganisms-microbial-derived-ingredients-used-food-partial-list>
27. World Health Organization, THE BURDEN OF FOODBORNE DISEASES IN THE WHO EUROPEAN REGION, 2017 (https://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0005/402989/50607-WHO-Food-Safety-publicationV4_Web.pdf, 08.05.2022)
28. World, Health Organization, Antibiotics resistance, 2020, (<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>)

Appendiks

Set-up micro titer plate BioScreen plate 1:

Control-B1	Control-B4	Control-B7	Control-B11	Nis-B1	Nis-B4	Nis-B7	Nis-B11		Blank medium
Control-B1	Control-B4	Control-B8	Control-B11	Nis-B1	Nis-B4	Nis-B8	Nis-B11		Blank medium
Control-B1	Control-B5	Control-B8	Control-B11	Nis-B1	Nis-B5	Nis-B8	Nis-B11		Blank medium
Control-B2	Control-B5	Control-B8	Control-B12	Nis-B2	Nis-B5	Nis-B8	Nis-B12		Blank medium
Control-B2	Control-B5	Control-B9	Control-B12	Nis-B2	Nis-B5	Nis-B9	Nis-B12		Blank medium/Nis
Control-B2	Control-B6	Control-B9	Control-B12	Nis-B2	Nis-B6	Nis-B9	Nis-B12		Blank medium/Nis
Control-B3	Control-B6	Control-B9	Control-B13	Nis-B3	Nis-B6	Nis-B9	Nis-B13		Blank medium/Nis
Control-B3	Control-B6	Control-B10	Control-B13	Nis-B3	Nis-B6	Nis-B10	Nis-B13		Blank medium/Nis
Control-B3	Control-B7	Control-B10	Control-B13	Nis-B3	Nis-B7	Nis-B10	Nis-B13		
Control-B4	Control-B7	Control-B10		Nis-B4	Nis-B7	Nis-B10			

Set-up micro titer plate BioScreen (LmRO15) plate 2:

Gar-B1	Gar-B4	Gar-B7	Gar-B11	Nis+Gar-B1	Nis+Gar-B4	Nis+Gar-B7	Nis+Gar-B11		Blank medium/Gar
Gar-B1	Gar-B4	Gar-B8	Gar-B11	Nis+Gar-B1	Nis+Gar-B4	Nis+Gar-B8	Nis+Gar-B11		Blank medium/Gar
Gar-B1	Gar-B5	Gar-B8	Gar-B11	Nis+Gar-B1	Nis+Gar-B5	Nis+Gar-B8	Nis+Gar-B11		Blank medium/Gar
Gar-B2	Gar-B5	Gar-B8	Gar-B12	Nis+Gar-B2	Nis+Gar-B5	Nis+Gar-B8	Nis+Gar-B12		Blank medium/Gar
Gar-B2	Gar-B5	Gar-B9	Gar-B12	Nis+Gar-B2	Nis+Gar-B5	Nis+Gar-B9	Nis+Gar-B12		Blank medium/Nis+Gar
Gar-B2	Gar-B6	Gar-B9	Gar-B12	Nis+Gar-B2	Nis+Gar-B6	Nis+Gar-B9	Nis+Gar-B12		Blank medium/Nis+Gar
Gar-B3	Gar-B6	Gar-B9	Gar-B13	Nis+Gar-B3	Nis+Gar-B6	Nis+Gar-B9	Nis+Gar-B13		Blank medium/Nis+Gar
Gar-B3	Gar-B6	Gar-B10	Gar-B13	Nis+Gar-B3	Nis+Gar-B6	Nis+Gar-B10	Nis+Gar-B13		Blank medium/Nis+Gar
Gar-B3	Gar-B7	Gar-B10	Gar-B13	Nis+Gar-B3	Nis+Gar-B7	Nis+Gar-B10	Nis+Gar-B13		
Gar-B4	Gar-B7	Gar-B10		Nis+Gar-B4	Nis+Gar-B7	Nis+Gar-B10			

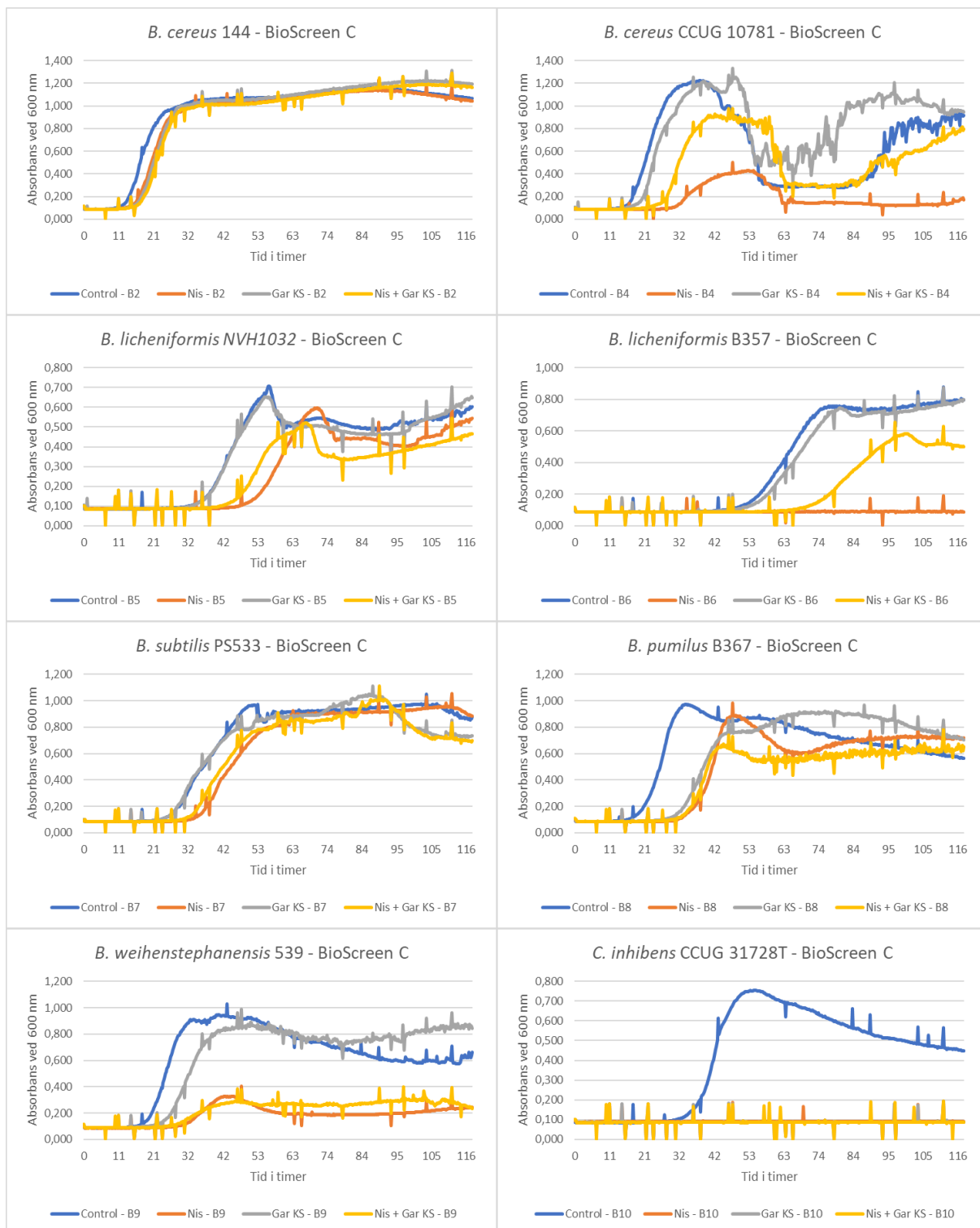
Figur 2: figur av hvordan oppsettet i mikrotiterplatene for BioScreen i 20°C så ut.

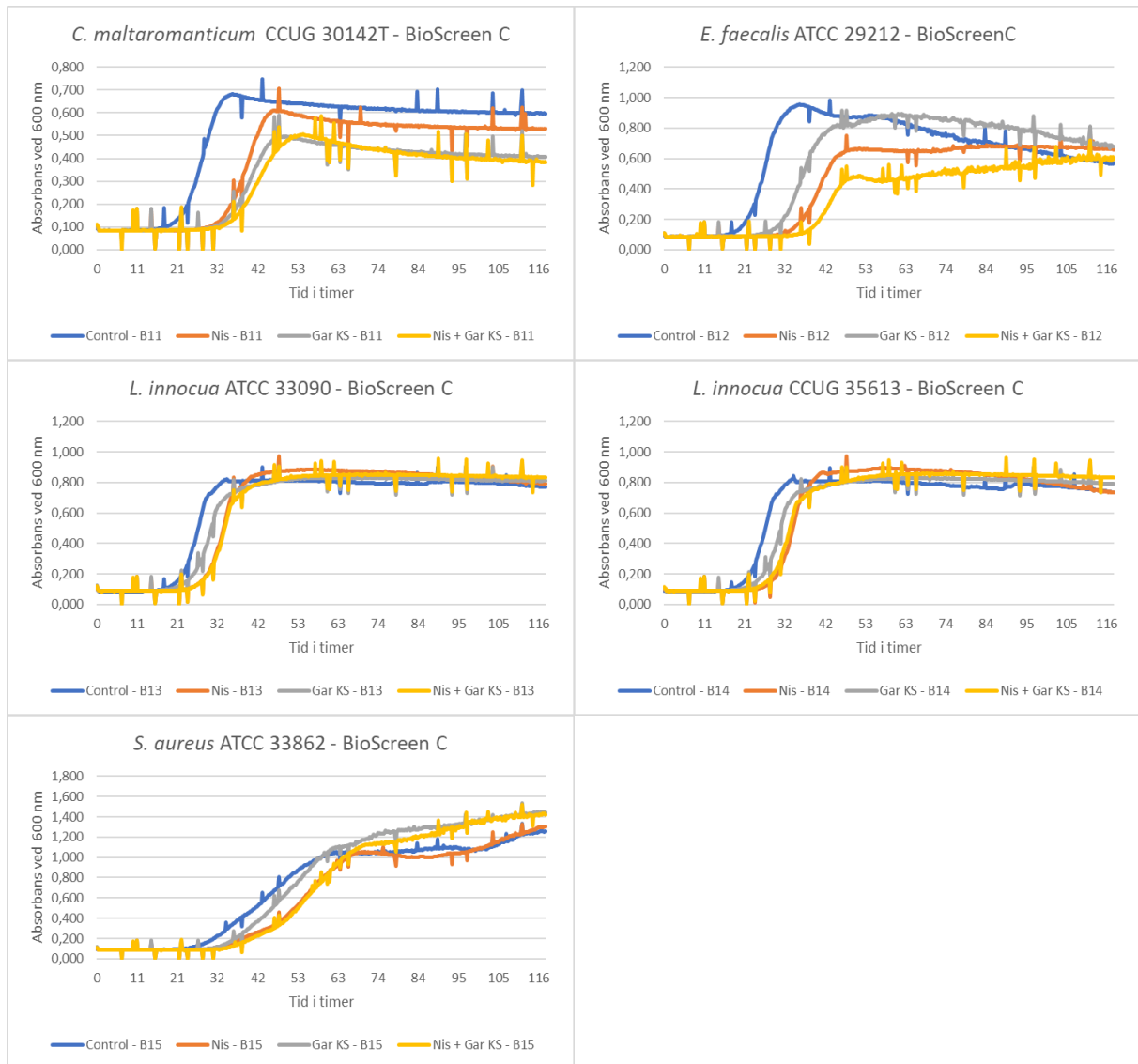
Set-up micro titer plate BioScreen (LmRO15) Checkerboard:

B1-A	B1-D	B4-A	B4-E	B9-B	B9-E	B11-C	B11-F	B13-C	Blank
B1-A	B1-D	B4-B	B4-E	B9-B	B9-F	B11-C	B11-F	B13-D	Blank
B1-A	B1-E	B4-B	B4-E	B9-C	B9-F	B11-C	B13-A	B13-D	Blank
B1-B	B1-E	B4-B	B4-F	B9-C	B9-F	B11-D	B13-A	B13-D	B m/Nis
B1-B	B1-E	B4-C	B4-F	B9-C	B11-A	B11-D	B13-A	B13-E	B m/Nis
B1-B	B1-F	B4-C	B4-F	B9-D	B11-A	B11-D	B13-B	B13-E	B m/Nis
B1-C	B1-F	B4-C	B9-A	B9-D	B11-A	B11-E	B13-B	B13-E	B m/Gar
B1-C	B1-F	B4-D	B9-A	B9-D	B11-B	B11-E	B13-B	B13-F	B m/Gar
B1-C	B4-A	B4-D	B9-A	B9-E	B11-B	B11-E	B13-C	B13-F	B m/Gar
B1-D	B4-A	B4-D	B9-B	B9-E	B11-B	B11-F	B13-C	B13-F	

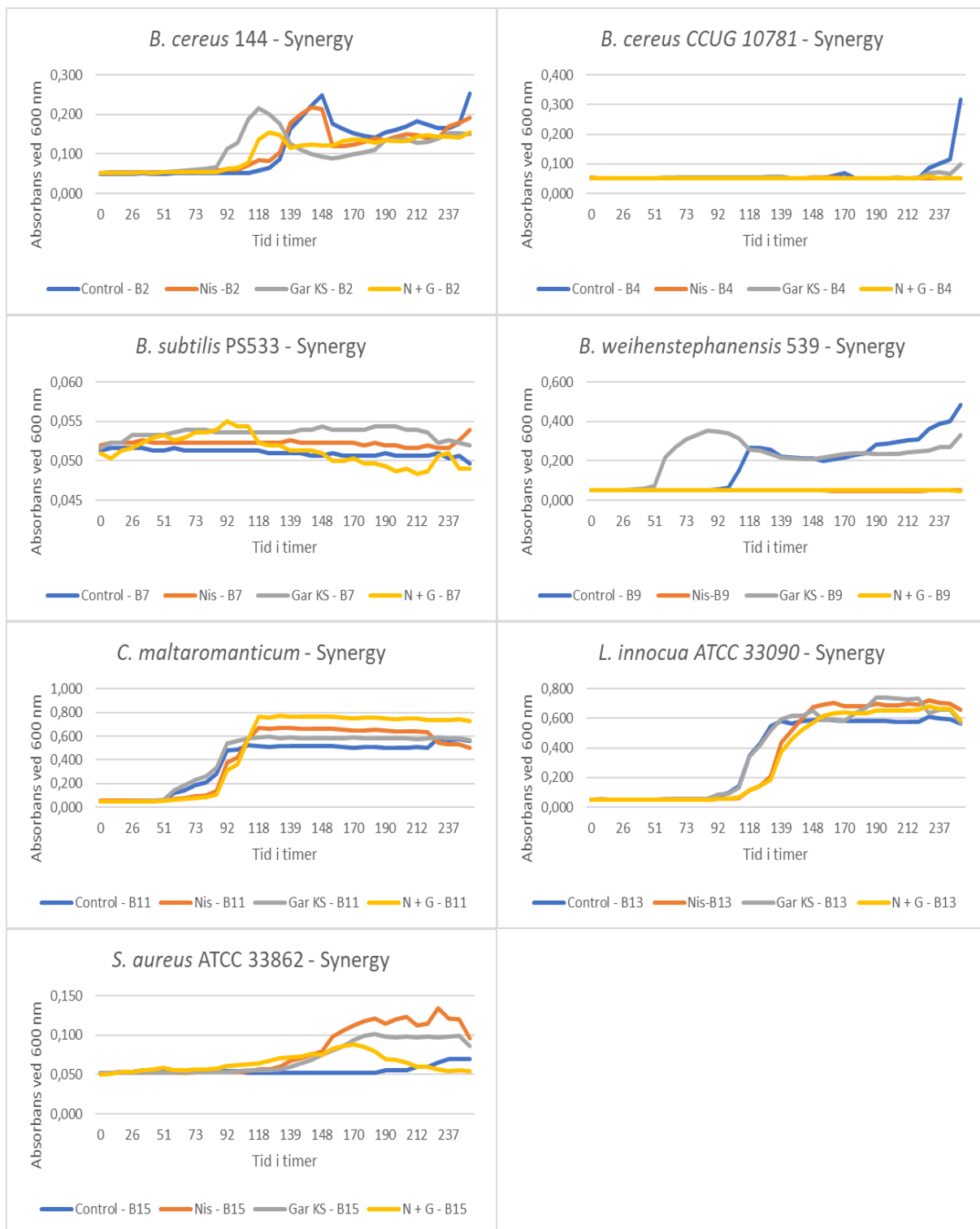
Figur 3: Oppsettet for Checkerboard analyse ved 20°C

Diagrammer av gjennomsnitt Bioscreen C:





Diagrammer av gjennomsnitt (Synergy):



Diagrammer av gjennomsnitt (Checkerboard):

