

CHALMERS TEKNISKA HÖGSKOLA

BIOLOGI OCH BIOTEKNIK - INDUSTRIELL BIOTEKNIK

KANDIDATARBETE

BBTX01-19-02

Bakteriella polysackarider - enzymatisk syntes och jakt på nya nedbrytande enzymer

Författare:

MARTINA BERGENTALL

CHRISTINA CHAU

ENYA ENGSTRÖM

SOFIA JOHANSSON

SANDRA LÖVGREN

EMMA NORDANGER

Handledare:

DAN KRSKA

JOHAN LARSBRINK

SCOTT MAZURKEWICH

Examinator:

EVA ALBERS



CHALMERS
UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

GÖTEBORG 16 maj 2019

Preface

We would like to thank the IndBio division at Chalmers, Dan Krska for his invaluable help in demonstrating how to work safely in the lab, Scott Mazurkewich for his outstanding homebrewed special medium, and Johan Larsbrink for his award-winning talent in guidance and assistance.

Bacterial Polysaccharides - Enzymatic Synthesis and a Search for New Degradative Enzymes

Abstract

A common problem in society today is tooth-related diseases caused by dental plaque. Dental plaque is a microbial biofilm which works like a protecting shield for organisms to live within, and consists of mostly water and polysaccharides. Dental plaque can eventually lead to diseases such as caries or tooth decay, hence treating dental plaque at an early stage is of importance. Despite preventional methods in use today, dental plaque is still a widespread global problem suggesting that these methods are insufficient. There are a limited number of enzymes known today which can break down mutan or alternan, which are two polysaccharides that can be found in the dental plaque matrix. This project aimed to isolate and categorise enzymes from microorganisms with the ability to break down mutan and alternan. A long-term goal with finding new enzymes able to break down the polysaccharides is to incorporate these enzymes in dental hygiene products.

Since mutan and alternan are not commercially available they were produced from the enzymes GtfJ and GtfL, and then purified by centrifugation and filtration. To confirm the purity, the polysaccharides were tested by reducing sugar analysis and thereafter freeze-dried before use. The polysaccharides were then used as a carbon source in cultivation plates and in liquid media when cultivating microorganisms. Field studies were carried out for collection of samples in two green belts around the Gothenburg area. The sampling included water and soil samples from different biotopes, which were introduced to cultivation plates made up of agar and alternan or mutan. A cultivation plate only containing agar was used as control. Growth was studied for a couple of weeks, and some colonies which showed growth with a clearing zone were restreaked on additional cultivation plates. Thereafter, samples were inoculated into liquid media for faster growth and to generate a sufficient amount of DNA for sequencing. Samples which showed growth after inoculation, and had a clearing zone when restreaked, were analysed by 16S and ITS sequencing. Results from the sequencing showed the possible presence of a known fungal species, *Brettanomyces bruxellensis*, and also the probable presence of five fungal and bacterial species belonging to the genera *Cladosporium* and *Paenibacillus*. Out of the six species discovered, five of them were able to break down mutan and one of them was able to break down alternan. Due to lack of time the purpose of isolating and characterising enzymes from said microorganisms could not be achieved, and hence it is a possible subject for further studies. These studies may involve enzyme efficiency and function *in vivo*, along with comparisons between several different enzymes in order to obtain optimal enzyme characteristics.

Sammanfattning

Ett vanligt problem i dagens samhälle är tandrelaterade sjukdomar orsakade av oral plack. Oral plack är en biofilm som fungerar likt en skyddande hinna för mikroorganismer och som till största delen består av vatten och polysackarider. Då mikroorganismerna på grund av biofilmen inte enkelt kan tas bort kan oral plack i längden leda till sjukdomar så som karies eller tandlossning. Att behandla oral plack i ett tidigt skede är därför av yttersta vikt. Trots dagens metoder för behandling av oral plack är det fortfarande ett utbrett globalt problem, vilket tyder på att de verktyg som finns idag inte är tillräckliga. I dagsläget är få enzymer kända som kan bryta ned mutan eller alternan, vilka är två polysackarider som ingår i matrisen hos oral plack. Projektet syftade därför till att isolera och kategorisera enzymer från mikroorganismer med möjlighet att bryta ned mutan och alternan. Ett långsiktigt mål med att hitta och studera nya enzymer som kan bryta ned polysackariderna är att tillämpa dem i tandhygieniska produkter.

Då mutan och alternan inte finns tillgängliga för kommersiellt bruk framställdes polysackariderna från de framrenade enzymerna GtfJ respektive GtfL. Polysackariderna renades därefter med centrifugering respektive filtrering. För att säkerställa renheten testades polysackariderna genom analys av antalet reducerande ändar, varpå de frystorkades innan användning. Polysackariderna användes sedan som kolkälla i odlingsplattor och i flytande medium vid odling av mikroorganismer. För insamling av mikroorganismer genomfördes fältstudier i två av Göteborgs grönområden, från vilka bland annat jord- och vattenprov introducerades till odlingsplattor. Odlingsplattorna innehöll agar tillsammans med en av de två polysackariderna, samtidigt som en odlingsplatta med endast agar användes som kontroll. Eventuell tillväxt studerades under ett par veckor och några av de kolonier som visade tillväxt med klar zon runt omkring sig återströks på odlingsplattor. Efter att återstrukna kolonier med klar zon isolerats inokulerades ett urval till flytande medium för snabbare tillväxt, samt för att bilda en tillräcklig mängd DNA för sekvenseringsanalys. De prov som vid återstrykning efter inokulering visade tillväxt med klar zon analyserades med hjälp av 16S- och ITS-sekvensering. Resultaten från sekvenseringarna medförde trolig identifiering av en känd svampart, *Bretanomyces bruxellensis*. Vidare indikerade resultaten även förekomsten av fem svamp- och bakteriearter tillhörande släktena *Cladosporium* och *Paenibacillus*. Av sex funna mikroorganismer hade fem av dem förmåga att bryta ned mutan, medan en av dem hade förmåga att bryta ned alternan. På grund av tidsbrist kunde inte syftet att isolera och karakterisera enzymer från de ovan nämnda mikroorganismerna uppnås, vilket är något framtida studier skulle kunna fortsätta undersöka. Dessa studier kan involvera enzyms effektivitet och funktion, tillsammans med jämförelser mellan flera olika enzymer för att få fram optimala egenskaper *in vivo*.

Innehållsförteckning

1	Vetenskaplig bakgrund	1
1.1	Mikrobiella biofilmer	1
1.2	Plack	1
1.2.1	Uppbyggnad och nedbrytning	2
1.2.2	Problemet med plack och möjliga lösningar	3
1.3	Enzymer	3
1.4	Bioprospektering och identifiering av mikroorganismer	4
2	Projektets syfte och ramar	5
2.1	Syfte	5
2.2	Avgränsningar	5
2.3	Samhälleliga och etiska aspekter	6
3	Metod	7
3.1	Framställning av enzymer	7
3.2	Tillverkning, rening och analys av polysackarider	7
3.3	Tillverkning av minimalmedium och gjutning av odlingsplattor	8
3.4	Provtagning och odling av mikroorganismer	9
3.5	Identifiering av odlade mikroorganismer med sekvensering	10
3.5.1	Provförberedelse inför sekvensering	10
3.5.2	Analys av sekvenseringsresultat	11
4	Resultat	12
4.1	Polysackaridframställning	12
4.1.1	Rening samt verifiering av enzymer	12
4.1.2	Mätning av reducerande ändrar	13
4.2	Odling av mikroorganismer	14
4.2.1	Mikroskopanalys	15
4.2.2	Tillväxt i flytande medium	17
4.3	Sekvensering av mikroorganismer	18
4.3.1	Provförberedelse inför sekvensering	18
4.3.2	Analys av sekvenseringsresultat	21
5	Diskussion	24
5.1	Val av metod	24
5.2	Erhållna resultat	25
5.2.1	Polysackaridframställning	25
5.2.2	Tillväxt av mikroorganismer	26
5.2.3	Sekvensering	27
5.3	Framtida studier	28
6	Slutsatser	29

Källförteckning

Bilaga A Medium

Bilaga B Prover

Bilaga C PCR-cykler

Bilaga D Bidragsrapport

Förkortningslista

<i>DNS</i>	3,5-Dinitrosalicylsyra
<i>e.v.</i>	Expect Value / Förväntansvärde
<i>EPS</i>	Extracellular Polymeric Substances / Extracellulära polymera substanser
<i>GH</i>	Glycoside Hydrolase / Glykosidhydrolas
<i>Gtf</i>	Glucosyltransferase / Glykosyltransferas
<i>IMAC</i>	Immobilized Metal Affinity Chromatography / Immobiliserad metalljonaffinitetskromatografi
<i>ITS</i>	Internal Transcribed Spacer / Intern transkriberad del av icke-kodande DNA
<i>LB</i>	Lysogeny Broth / Lysogenilösning
<i>nBLAST</i>	Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool / Grundläggande sökverktyg för lokal nukleotidanpassning
<i>p.i.</i>	Percent Identity / Procentuell Identitet
<i>SDS – PAGE</i>	Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis / Natriumdodecylsulfat-polyakrylamid-gelelektrofores
<i>TAE</i>	Tris-Acetate-Ethylendiaminetetraetansyra
<i>Tris</i>	Tris(hydroxymetyl)aminometan

1 Vetenskaplig bakgrund

Tandrelaterade sjukdomar orsakas eller förstärks ofta av biofilmer som skyddar mikroorganismer från yttre påverkan. Biofilmen som orsakar bland annat karies kallas för oral plack; hädanefter enbart benämnd "plack". I dagsläget används ofta munskölj och tandborstning i preventivt syfte, men då plack fortfarande är ett utbrett samhällsproblem är det av stort intresse att finna alternativa sätt att behandla plack än de som redan finns idag. Det saknas belägg för att människor naturligt skulle ha några enzymer i munhålan som kan bryta ned de polysackarider som bygger upp plack [1]. Däremot finns det flera andra levande organismer med förmåga att producera sådana typer av enzymer [2, 3]. Enzymer kan vara ett bra alternativ eller komplement till dagens metoder för att motverka plack, då enzymer är mycket effektiva samtidigt som de varken är miljöfarliga eller skadliga för hälsan.

1.1 Mikrobiella biofilmer

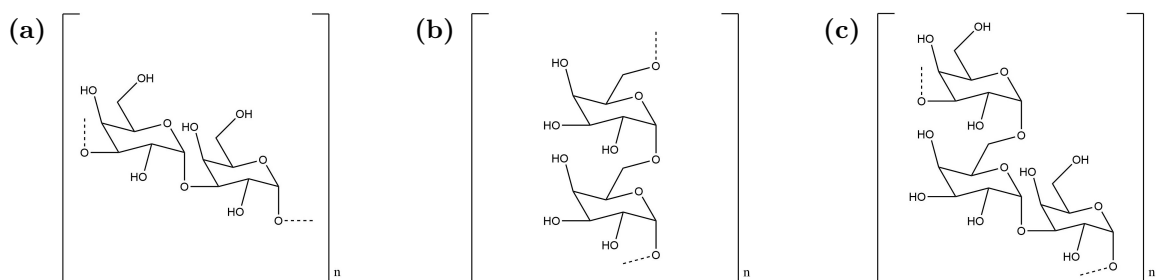
Biofilmer är ett samlingsnamn för en matris bestående av bland annat vatten, proteiner och olika polysackarider som tillsammans bildar en tunn hinna. Mikroorganismer kan använda sig av biofilmer för att skapa en optimal miljö att växa i som samtidigt skyddar mot eventuella angrepp från omgivningen, exempelvis från värdens immunförsvar [1]. Det finns olika typer av mikroorganismer, däribland bakterier och svampar, med förmåga att bilda biofilmer [4]. Oavsett vilken eller vilka arter av mikroorganismer som frodas inuti en biofilm så är det komponenterna i biofilmens matris som avgör dess egenskaper, däribland struktur och förmåga att fästa vid ytor. Matrisen består till största delen av vatten (cirka 90 %); resterande delar är så kallade extracellulära polymera substanser (EPS; Extracellular Polymeric Substances) samt bakterier. Då EPS utgör en viktig del av biofilmens matris är det av intresse att studera vilka polysackarider den består av, deras egenskaper samt hur de vid behov skulle kunna brytas ned [1, 5].

1.2 Plack

Som redan nämnt är plack en vanligt förekommande biofilm vars förekomst påverkar människans munhygien och hälsa. Plack växer på ytor i vår mun och däribland våra tänder, vilket kan orsaka stora problem. Om plack inte tas bort kontinuerligt kan mineraliseringen av plack leda till tandsten som i sin tur kan leda till inflammation i tandköttet och i värsta fall tandlossning. Då tandsten bildas måste en tandläkare uppsökas för att ta bort det, vilket blir kostsamt för individen själv samt samhället [6]. Därmed hade det varit bra att kunna angripa plackbildningen i ett tidigt skede.

1.2.1 Uppbyggnad och nedbrytning

Plack bildas genom att bakterier häftar sig fast vid tandytan och genererar en skyddande biofilm, vilket skapar förutsättningar för flera olika arter av bakterier att växa [5, 7]. Studier har visat att polysackariderna i EPS:en hos plack till största delen är uppbyggda av D-glukosmonomerer [1]. Polysackariderna är huvudsakligen mutan, dextran samt alternan och deras uppbyggnad av biofilsmatrisen leder till ett oordnat, tredimensionellt nät. Om polysackariderna går att bryta ned kan matrisens struktur således förstöras och bakterierna kan kommas åt. Mutan och dextran är linjära polymerer bestående av α -1,3- respektive α -1,6-glukan. I plack förekommer oftast även en tredje typ av polysackarid som kallas för alternan, med alternerande α -1,3- och α -1,6-bindningar. Mutan, dextran och alternan är klibbiga och fäster på ytor, vilket gör att de inte kan spolats bort med vanliga orala sköljmedel [1]. Strukturer för de tre polysackariderna presenteras i Figur 1. Notera att mutan och dextran har en typ av bindning genom hela molekylen, till skillnad från alternan som istället har alternerande α -1,3- och α -1,6-bindningar.



Figur 1: Strukturer för de olika polysackariderna i plack, ritade i ChemDraw. Medan mutan och dextran enbart har α -1,3- respektive α -1,6-bindningar så alternerar alternan mellan de båda varianterna. Observera att bindningsvinklarna inte är korrekta. a) Struktur för mutan. b) Struktur för dextran. c) Struktur för alternan.

I vår orala miljö använder kroppen flera olika enzymer, däribland amylas, för att inleda nedbrytningen av mat [8]. Amylas verkar för att bryta ned α -1,4-bindningar i polysackarider [9]. Då varken mutan, dextran eller alternan har liknande struktur kan inte enzymer i människans naturliga orala miljö bryta ned bakteriernas biofilm [1, 10]. Människans oförmåga att bryta ned biofilmen gör det nödvändigt att försöka hitta enzymer i naturen med funktioner som kan hantera polysackaridernas struktur [9]. Om ingen form av anrikning syns i naturen innebär det att polysackarider som byggts upp också på något sätt måste ha brutits ned. Mutan har påträffats bland flera olika svamp-, jäst- och bakteriearter [1], dock utan tecken på anrikning vilket innebär antingen att organismerna naturligt kan producera enzymer som kan bryta ned mutan, eller att de blir uppätta av andra organismer med den förmågan. Studier har hittat organismer som innehåller enzymet mutanas (α -1,3-glukanas), vilket kan bryta ned mutan, men generellt är enzymer med funktion att bryta ned någon av de tre polysackariderna fortfarande relativt okända [11].

1.2.2 Problemet med plack och möjliga lösningar

Bakterier gynnas av den skyddande miljön som plack utgör. Flera av bakteriearterna producerar syror när de fermenterar enkla sockerarter [12]. Syrorna leder ibland till frätskador som i sin tur kan leda till karies, andra sjukdomar och i vissa fall även tandlossning [13]. Obehandlad plack kan bilda tandsten samt även orsaka inflammationer som leder till allvarigare problem både i munhålan och i andra delar av kroppen [14, 15]. Att kontrollera tillväxten av plack är därför av yttersta vikt för att behålla en god munhygien och undvika andra sjukdomar [1]. I dagsläget används huvudsakligen tandhygieniska produkter, så som tandborstar och munskölj, samt regelbundna tandläkarbesök för att motverka plack [5]. Det finns dock behov av att utveckla nya metoder för behandling av plack, bland annat på grund av den resistens bakterier kan bygga upp mot de kemiska ämnena i exempelvis tandkräm vid regelbunden och kontinuerlig användning [1]. Vidare är förekomsten av plack i dagsläget mycket utbredd, vilket tyder på att dagens metoder inte är tillräckliga för att motverka plack. Ett alternativ till de metoder som används idag kan vara att hitta enzymer vars funktion är att bryta ned polysackariderna i plack och således förstöra biofilmens struktur och därigenom bakteriernas skydd [1]. Då enzymer enbart angriper en mycket specifik kemisk bindning kan de i många fall anses vara säkrare och bättre än många andra ämnen, som vid eliminering av plack även kan råka skada eller bryta ned tandkött och/eller tändernas emalj. Då inga mänskliga celler har förmåga att producera α -1,3- eller α -1,6-glukaner är det inte troligt att ett enzym som kan bryta ned dem skulle vara skadligt för människokroppen.

1.3 Enzymer

Enzymer är katalyserande proteiner med mycket specifika funktioner som används för att öka kemiska reaktionshastigheter utan att själva förbrukas [10]. Vid studie av enzymer relaterade till plack är det av intresse att studera både de enzymer som bildar polysackariderna i plack och de som kan bryta ned dem. Ett samlingsnamn för enzymer som bildar glukaner (så som mutan, dextran och alternan) är glykosyltransferas (Gtf; Glucosyltransferase). Olika Gtf-enzym producerar olika, specifika glukanstrukturer [16]. Enzymet GtfJ, isolerat från *Streptococcus salivarius*, bildar polysackariden mutan. Enzymet använder sig av sukros, vars glukos-del länkas ihop med andra glukosmolekyler till α -1,3-glukan [17]. Vidare finns i Gtf-familjen även enzymet GtfL vilket istället bildar alternan. GtfL producerar alternan nästan på samma sätt som GtfJ producerar mutan; skillnaden är att glukos istället länkas ihop växelvis med α -1,3- och α -1,6-bindningar.

För att kunna använda sig av enzymreaktioner vid nedbrytning av biofilmer, bland annat plack, måste enzymer hittas vars funktion gör att de specifikt kan bryta ned polysackariderna i biofilmens matris. Vid studie av enzymer vars funktion är att bryta ned mutan har, som tidigare nämnts, mutanas påträffats. Mutanaser har återfunnits hos både svampar och bakterier; skillnaderna mellan de olika typerna skulle dock behö-

va undersökas ytterligare. I dagsläget finns mycket begränsad biokemisk och strukturell information om mutanaser; mer är dock känt om dessa än om enzymer som kan bryta ned dextran och alternan. Mutanaser tillhör olika enzymfamiljer, med samlingsnamnet glykosidhydrolas (GH; Glycoside Hydrolase), beroende på om de återfinns i svampar eller i bakterier. Mutanaser som återfinns i svampar tillhör enzymfamiljen GH71 medan bakteriella mutanaser tillhör GH87 [11]. I svampar återfinns mutanaser ofta i svampens cellvägg där deras funktion är att reglera mängden mutan. Bakteriellt mutanas har visat sig kunna bryta ned mutan från både plack och cellväggar [11].

1.4 Bioprospektering och identifiering av mikroorganismer

Bioprospektering kan förklaras som systematiska försök att finna biologiska resurser som är till nytta för människan genom att samla in prov från naturen och hoppas på slumpmässiga fynd [18]. Då en organism med önskade egenskaper upptäcks via bioprospektering sekvenseras dess DNA för att ta reda på organismens arttillhörighet. Olika sekvenseringsmetoder används beroende på typ av organism; svampar sekvenseras normalt med primers relaterade till en intern transkriberad del av icke-kodande DNA (ITS; Internal Transcribed Spacer) [19]. Bakterier sekvenseras istället med 16S-sekvensering. Vid ITS-sekvensering analyseras ITS-regionerna ITS1 och ITS2, vilka är icke-kodande DNA-segment hos växter och svampar [20]. ITS1 motsvarar regionen mellan rRNA-generna 18S och 5,8S, medan ITS2 motsvarar regionen mellan rRNA-generna 5,8S och 26S [21, 22]. Vid sekvensering används primers som korresponderar mot bitar av DNA som ligger strax innan och efter ITS-regionerna. Då ITS-regionerna skiljer sig åt mellan olika svamparter blir DNA-sekvensen som erhålls efter sekvensering specifik för varje enskild art. Vid 16S-sekvensering är det istället konstanta delar av 16S-rRNA-genen hos bakterien som primern binder in till. När 16S-rRNA-genen jämförs mot en databas undersöks bakteriernas fylogeni (utvecklingshistoria) genom deras specifika hypervariabla regioner; områden i 16S-rRNA-genen där DNA-sekvensen varierar mycket mellan olika arter [23]. Områdenas position varierar beroende på bakterieart, vilket möjliggör karakterisering av bakterierna [24]. ITS-regionerna och 16S-rRNA-genen finns i alla svampar respektive bakterier, vilket gör att sekvenseringsmetoderna kan användas även för prov där det är okänt vilka typer av svampar respektive bakterier som förekommer.

När sekvenseringsresultaten sedan jämförs mot en databas fås en så kallad procentuell identitet (p.i.”; Percent Identity) som talar om hur väl den jämförda sekvensen matchar med redan karakteriserade sekvenser som finns lagrade i databasen. Därmed ges en första indikation på organismens släktskap, då två sekvenser som stämmer överens med $\geq 97\%$ kan anses tillhöra samma art [22, 25, 26]. Detta innebär också att en ny art kan ha upptäckts om p.i. understiger 97% , eftersom variationerna är små för att det ska röra sig om två olika arter.

2 Projektets syfte och ramar

I följande avsnitt presenteras projektets syfte samt relevanta delmål. Därefter följer en beskrivning av nödvändiga avgränsningar som gjordes för att försöka uppnå projektets huvudsyfte under den utsatta tidsramen. Slutligen diskuteras de samhälleliga och etiska aspekter som bör tas i beaktande under projektets gång samt vid fortsatta studier.

2.1 Syfte

Projektets huvudsakliga syfte var att isolera och kategorisera nya enzymer med förmåga att bryta ned polysackariderna mutan och alternan, vilka återfinns i plack. Enzymer med sådan förmåga återfinns ofta i mikroorganismer och det huvudsakliga syftet delades därför in i flera delmål. Delmålen inkluderade att undersöka förekomsten av dessa mikroorganismer i olika naturmiljöer för att därefter kultivera, sekvensera och kategorisera dem.

2.2 Avgränsningar

Projektet avsåg försöka hitta åtminstone en mikroorganism som kunde växa på mutan och/eller alternan och därmed producerar sökta enzymer. Då många sådana fynd gjordes fokuserades det på några få utvalda mikroorganismer som upplevdes vara mest fördelaktiga utifrån aspekter så som tillväxttid, kolonistorlek samt mängd utsöndrade enzymer. Avgränsningen gjordes då det inte fanns tid och resurser för studier av alltför många arter av mikroorganismer inom projektets ramar. Mikroorganismernas tillväxttid begränsades till fyra veckor från utstrykningsdatum och om ingen synlig tillväxt på mutan eller alternan fanns efter denna tidsperiod undersöktes provet inte vidare. Vid den händelse att mikroorganismerna skulle ha vuxit på mutan eller alternan, men tar längre tid än fyra veckor på sig att börja växa, skulle det ha saknats projekttid för vidare undersökning av mikroorganismens aktiva enzymer för nedbrytning av mutan eller alternan. De mikroorganismer som valdes ut för fortsatta studier började växa fort efter utstrykning på plattorna.

Då många mikroorganismer lever i antingen symbios eller konkurrens med varandra förväntades det att få flera olika mikroorganismer på samma platta, eller till och med i samma koloni. I metoddelen beskrivs försök att separera och isolera enskilda arter för att få dem att bilda kolonier från en enda cell. Fokus låg på de arter som lyckades isoleras för att underlätta analys av mikroorganismerna, samt för att kunna fastställa en koppling mellan mikroorganism och enzym inom den relativt korta tidsram projektet arbetade efter. Ytterligare en avgränsning som gjordes var att enbart undersöka vidare de mikroorganismer där det tydligt gick att se att mikroorganismen använt mutan eller alternan som kolkälla. De fall där det fanns en möjlighet att mikroorganismen vuxit

endast på agar uteslöts därför från vidare studier. Slutligen begränsades fältstudien till att prov enbart togs från några få områden, då flera växande mikroorganismer återfanns redan efter två provtagningstillfällen. Avgränsningen gjordes för att kunna fokusera på de mikroorganismer som vuxit från dessa prov och redan visat önskat resultat.

2.3 Samhälleliga och etiska aspekter

Mycket forskning som genomförs har etiska aspekter att ta i beaktande. I projektet är insamlingen av jordprov ett exempel på en sådan aspekt. I Sverige råder allemansrätt och att ta mindre jordprov från skog och mark betraktas inte som brottsligt, såvida det inte handlar om ett naturskyddsområde [27]. Fältarbetet utfördes huvudsakligen i Änggårdssbergen samt Skatås- och Delsjöområdet i Göteborg. Både Änggårdssbergen och delar av Delsjöområdet är naturreservat [28, 29], vilket innebär att särskilda föreskrifter gäller på platserna. I Änggårdssbergen får växter inte plockas eller grävas upp, vilket togs hänsyn till genom att inga hela växter grävdes upp eller förstördes. Endast små skrapprov eller ympningar togs från svampar på nedfallna träd och från mossor på stenar. Även avföringsprov från djur samt små jord- och vattenprov togs, dock utan att störa omgivande växters rötter.

De positiva värden som skulle kunna erhållas ur forskningen är upptäckten av enzymer som, förutom att bryta ned biofilm vid plackbildning, även är relativt billiga och enkla att framställa i större kvantitet. Resultatet skulle kunna ha en stor positiv inverkan på människors munhygien men kanske även ha betydelse för bekämpningen av andra sjukdomar med liknande biofilmsproblematik. Enzymer är redan vanligt förekommande komponenter i flera munvårdsprodukter idag, så som tandkräm, varför just enzymanvändning i sig inte bör vara något större problem även i framtida munvårdsprodukter även om det är "nya" sorters enzymer som används. Ett möjligt framtida etiskt dilemma är om forskningsresultatet leder till ett funnet enzym som kan bryta ned plack, men som är relativt kostsamt att framställa i större mängder. Då framkommer frågeställningar kring vem eller vilka som ska ha rätt att behandlas med enzymet, vem som ska bekosta det och vilka kriterium som ska uppfyllas för att få tillgång till värden.

3 Metod

Syftet med projektet angreps genom tillämpning av den redovisade metodiken i följande avsnitt. Projektet inleddes med tillverkning av polysackariderna mutan och alternan, vilka sedan användes som utgångsmaterial för vidare experiment. Tillvägagångssätt för syntes, rening och analys av de tillverkade polysackariderna beskrivs nedan. Därefter redovisas metodiken för fältstudierna med insamling av prov, samt hur proven sedan undersöktes för att se om de hade förmåga att bryta ned sagda polysackarider. Till sist redovisas hur olika sekvenseringsmetoder användes för att detektera förekomst av olika arter av svampar och bakterier. I samtliga fall där vatten användes avses ultrafiltrerat vatten av märket Milli Q (MQ).

3.1 Framställning av enzymer

Vid tillverkning av polysackariderna mutan och alternan användes enzymerna GtfJ (för tillverkning av mutan) samt GtfL (för tillverkning av alternan) från bakteriearten *Streptococcus salivarius*. De kodande gensekvenserna för sagda enzymer klonades i *Escherichia coli* varpå cellerna odlades i flytande medium. Odling och isolering av enzymerna utfördes av handledare innan projektets start. Enzymerna renades därefter fram med särskilda kolonner med metalljonaffinitet (IMAC; Immobilized Metal Affinity Chromatography), vilka innehöll positivt laddade kromatografipärlor suspenderade i 20 %-ig etanol. Pärlorna renades genom att vatten samt 1 L tvättbuffert (50 mM tris(hydroximetil)aminometan (Tris), 100 mM NaCl) tillsattes till kolonnen. Efter rening tillsattes GtfL samt GtfJ i separata IMAC-kolonner, varpå enzymerna fäste till pärlorna genom affinitet mellan enzymernas negativa och pärlornas positiva laddning. Därefter tillsattes ytterligare tvättbuffert och slutligen 500 mL av en lösning liknande tvättbufferten (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 200 mM imidazol) till kolonnerna. Den sistnämnda lösningen medförde att enzymerna förlorade sin affinitet till pärlorna och därmed släppte från dem och kunde samlas upp i ett provrör. I provröret tillsattes sedan HCl tills dess att lösningen nådde pH 8. De framrenade enzymerna analyserades slutligen med gelelektrofores (SDS-PAGE; Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis) för att verifiera att korrekt enzym renats fram från lösningen. Efter analysen användes enzymerna för framställning av mutan och alternan.

3.2 Tillverkning, rening och analys av polysackarider

Enzymerna GtfJ och GtfL tillsattes till separata behållare innehållande 1 L sukroslösning (1 M sukros, 0,15 M citrat) vardera. Citratet tillsattes för att få en sukroslösning med pH 5,5, vilket anses vara optimalt för enzymerna [17]. Då pH inte nådde 5,5 efter tillsatsen av citrat tillsattes även HCl, tills pH 5,5 nåddes. Därefter steriliserades lösningen genom filtrering. Enzymer och sukroslösning överfördes till 15 mL Falconrör

och placerades i skakinkubatorer i 30 °C. Rör innehållande GtfJ inkuberades i tre dygn och rör med GtfL inkuberades i fyra dygn. Efter tillverkning renades polysackariderna från kvarvarande enzym, sukros-, glukos- och fruktosmolekyler innan användning. Rening utfördes genom två olika metoder beroende på polysackarid. Alternan renades genom filtrering där lösningen hälldes genom ett filter med Assymetric PolyEterSulfon (aPES)-membran, porstorlek 0,2 µm, tillsammans med 1 L vatten i taget tills dess att 10 L vatten hade passerat filtret. Mutan renades genom att provrören centrifugerades tolv gånger. Varje centrifugeringscykel genomfördes i 4 °C, 9000 rpm och varade i 20 minuter. Efter varje enskild centrifugering hälldes supernatanten av och pelleten resuspenderades i 10 mL vatten. Efter rening frystorkades båda polysackariderna för att eliminera kvarvarande vatten. Efter frystorkning uppmättes torrvikten och utbytet beräknades.

För att säkerställa tillräcklig rening av polysackariderna analyserades alla prov från polysackaridreningen med en 3,5-Dinitrosalicylsyra (DNS)-analys i spektrofotometer. DNS-analys är en metod som mäter mängden reducerande sockerändar i ett prov genom att DNS reagerar med ändarna och bildar en mörk färg; ju fler reducerande ändar desto mörkare färg [30]. Glukos- och fruktosmolekyler har en ände som är reducerande och en som inte är det. När glukos- och fruktosmolekylerna sitter ihop i långa kedjor, så som mutan och alternan gör, binder de reducerande ändarna till andra molekyler och endast den yttersta molekylen i kedjan har sin reducerande ände tillgänglig för DNS att reagera med. Detta innebär att om det finns många korta kedjor istället för några få långa, eller om det rentav finns ensamma glukos- eller fruktosmolekyler, kommer DNS-analysen ge utslag för de många reducerande ändarna i form av en mörkare färg och provet bedöms inte vara rent. Provtagningen inför analysen utfördes på olika sätt beroende på reningsmetod. Under reningen av mutan togs prov efter varje enskild centrifugering. För alternan togs istället prov före, i mitten av och efter filtrering. Samtliga prov förbereddes för spektrofotometeranalys genom att 1 mL från varje prov centrifugerades, varpå supernatanten från centrifugeringen överfördes till nya rör. Därefter skapades tre replikat från varje prov, där varje replikat innehöll 100 µL DNS samt 100 µL korresponderande prov. Samtliga replikat sattes på värmeblock (105 °C) i tio minuter. Därefter centrifugerades de i några sekunder innan de överfördes till en platta för analys i spektrofotometer. Resultatet från analysen jämfördes med en framtagen standardkurva för glukos, för att kontrollera att koncentrationen av reducerande ändar i supernatantproven inte fanns i signifikant mängd.

3.3 Tillverkning av minimalmedium och gjutning av odlingsplattor

Odlingsplattor tillverkades genom att M9-medium blandades med agar och respektive polysackarid. M9 är ett så kallat minimalmedium och tillverkades enligt ett färdigt protokoll, se Bilaga A. Tre olika sorters plattor gjordes; en med mutan som kolkälla,

en med alternan som kolkälla samt en med enbart agar. Agarplattorna användes som kontroll då även mutan- och alternanplattorna innehöll agar. Utifrån agarplattorna kunde då eventuell tillväxt som enbart berodde på att mikroorganismerna kunde bryta ned agar uteslutas.

3.4 Provtagning och odling av mikroorganismer

För att hitta mikroorganismer med förmåga att bryta ned mutan och/eller alternan genomfördes fältarbete i olika naturmiljöer. Fältarbetet innebar att prov från varierande miljöer och biotoper samlades in; för fullständig lista över prov som togs, se Bilaga B. Varje insamlat prov ströks ut på fyra mutanplattor, fyra alternanplattor samt fyra agarplattor (totalt tolv plattor per insamlat prov). Varje sorts platta placerades sedan i fyra olika odlingsmiljöer: anaerobt, 4 °C, 37 °C samt rumstemperatur. Då önskvärd tillväxt noterats återströks separata kolonier på nya mutan- och alternanplattor, för att sedan placeras i den ursprungliga odlingsmiljön. Endast mikroorganismer som tydligt vuxit på mutan eller alternan återströks, vilket kännetecknades av att organismen vuxit hela vägen ned till plattans botten och/eller att en "klar zon" hade bildats. Mutan och alternan gav de annars genomskinliga plattorna en vitare färg, men då en så kallad "klar zon" bildats innebar det att den vita färgen försvunnit inom ett visst område kring organismen, vilket beror på att organismen initierat enzymatisk nedbrytning av polysackariden. Om tydliga klara zoner noterades vid tillväxt ansågs det vara tillräckligt bevis för att organismerna vuxit på polysackariderna, även om viss tillväxt även kunde observeras på kontrollplattan med agar. Ett urval av de organismer som visat tillväxt med klar zon samt återstrukits odlades i flytande medium. Förhoppningen med detta var att snabbare tillväxt samt enklare separering och selektering av organismer skulle kunna uppnås. Sex kolonier med tydligt klara zoner inokulerades i tre olika flytande medium: lysogenilösning (LB; Lysogeny Broth), M9-mutan samt M9-alternan. Innehållet i varje specifikt medium redovisas i Bilaga A. Flaskorna placerades sedan i skakinkubator med temperatur motsvarande odlingsplattan, det vill säga rumstemperatur eller 37 °C. När tillväxt noterats återströks ett prov från flaskan på en mutan- eller alternanplatta för att säkerställa att det fortfarande bildades en klar zon.

Från varje odling togs även stamlösningar för eventuella framtida studier, vilket gjordes genom att 500 µL vätska från respektive odling blandades med 500 µL glycerol i ett kryorör och lagrades i -80 °C. Efter att stamlösning tagits överfördes cellerna till 50 mL Falconrör som centrifugerades. Supernatanten hälldes ut och cellerna förvarades därefter i -20 °C för senare användning vid sekvensering.

3.5 Identifiering av odlade mikroorganismer med sekvensering

De mikroorganismer som odlats i flytande medium, samt även visat en klar zon vid återodling på platta, analyserades med sekvensering. Då det var okänt vilken eller vilka typer av organismer som växte i mediet användes två olika sekvenseringsmetoder; ITS-sekvensering för svampar och 16S-sekvensering för bakterier. Vid både ITS- och 16S-sekvensering användes en framåt- och en bakåtriktad primer för att få ett mer tillförlitligt resultat, vilket i praktiken innebär att varje sekvens sekvenseras två gånger (en gång från varje håll). Varje prov förbereddes därmed i två replikat, ett för varje primer, varefter proven skickades vidare till företaget Eurofins för Sangersekvensering.

3.5.1 Provförberedelse inför sekvensering

Proven förbereddes inför sekvensering genom att nedfrusna celler från varje odling tinades i rumstemperatur. Cellerna pipetterades sedan ned i tre provrör per enskilt prov för att få tre replikat. 1 μL celler blandades med 10 μL vatten i märkta PCR-rör. Rören centrifugerades i ett par sekunder och kokades därefter i tio minuter varefter de centrifugerades i ytterligare ett par sekunder. Supernatanten överfördes till 1,5 mL provrör. I PCR-rör pipetterades 4 μL 0,5x buffert, 2 μL framåtriktad eller bakåtriktad primer, 0,4 μL dNTP, 0,2 μL Phusion-enzym samt 1 μL av det förberedda DNA-templatet med den okända sekvensen. Rören centrifugerades därefter i ett par sekunder innan PCR genomfördes; inställningar för PCR-cykeln presenteras i Bilaga C.

Gelelektrofores användes för att säkerställa att PCR-reaktionen fungerat, samt för att bestämma erhållen mängd DNA. Gelelektroforesen utfördes genom att 4 μL DNA Gel Loading Dye (6x) pipetterades ned i proven. Proceduren gav en totalvolym på 24 μL per prov. En 1 %-ig agaroslösning förbereddes genom att 4 g agaroslösning löstes upp i 400 mL 0,5x Tris-Acetat-Etylendiamintetraetsyra (TAE)-buffert. Hela innehållet av proven, samt 5 μL av 1 kb DNA-stege, pipetterades ned i separata brunnar i den förberedda agarosgelen. 0,5x TAE-buffert samt 1x TAE-buffert hälldes över plattan innan gelelektrofores kördes i 30 minuter. Därefter lades agarosgelen i en aluminiumomsluten behållare med GelGreen i 30 minuter med kontinuerlig skakning. Gelen analyserades först genom att banden fotograferades i UV-ljus i maskinen Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad) för avläsning av antalet DNA-fragment per prov. Programmet som användes var Image Lab 6.0 (Bio-Rad). Därefter togs gelen till ett mörklagt rum med enbart UV-ljus som ljuskälla. De fragment som visade en stark färg skars ut och DNA extraherades ur proven enligt protokollet GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific) [31]. Efter extraktion från gelen analyserades proven med en nanodrop-spektrofotometer (NanoDrop 2000/2000c) med vilken koncentrationen DNA i proven kunde mätas. Endast de prov med en koncentration över 5 ng/ μL kunde skickas iväg för sekvensering till företaget Eurofins [32]. Från de prov med tillräckligt hög koncentration överfördes 15 μL till två provrör. I det ena provröret tillsattes framåtriktad primer, medan det i

det andra tillsattes bakåtriktad primer. Ovanstående metod upprepades tills dess att det från varje odlingsflaska fanns fyra rör; ett med framåtriktad primer för ITS, ett med bakåtriktad primer för ITS, ett med framåtriktad primer för 16S samt ett med bakåtriktad primer för 16S.

3.5.2 Analys av sekvenseringsresultat

Resultatet som skickas tillbaka till beställaren från Eurofins är vanligtvis ett textdokument med både sekvenseringsdata samt den sekvens som avlästs från sagda data. Sekvensen kan sedan analyseras med olika metoder och jämföras med redan kända organismers DNA för att bestämma exempelvis släkte eller art. Ett vanligt förekommande analysredskap för DNA-sekvenser är sökverktyget nBLAST (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool); en algoritm som jämför den inmatade nukleotidsekvensen med kända nukleotidsekvenser från en databas. Erhållna resultat i projektet analyserades med nBLAST varefter resultaten med framåt- respektive bakåtriktad primer jämfördes med varandra. Från analys med nBLAST valdes det släkte som visade högst p.i., vilket är ett mått på hur många nukleotider som stämmer överens mellan den analyserade och den jämförda DNA-sekvensen. Även ett så kallat förväntansvärde ("e.v."; Expect Value), vilket är hur många slumpmässiga träffar som fås av den inmatade sekvenslängden, togs hänsyn till. För en optimal analys önskas ett så högt p.i. samt ett så lågt e.v. som möjligt [33]. Utifrån resultatet kan sedan slutsatser dras angående vilket släktskap eller vilken art organismen som sekvenserats tillhör.

4 Resultat

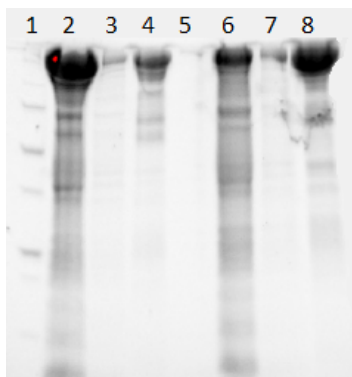
Nedan följer projektets resultat från valda delar av den genomförda metoden. Inledningsvis presenteras resultat från olika steg i framställningen av polysackarider; därefter presenteras resultat från odling av prov tagna under fältarbetet. Avslutningsvis presenteras resultat från sekvenseringen av valda odlingsprov. Alla odlingsplattor är numrerade; fullständig lista med referenser till odlingsplattor från alla provtagningar redovisas i Bilaga B.

4.1 Polysackaridframställning

Vid två framställningar av polysackariderna erhöles totalt 48,7 g mutan och 35,3 g alternan. För varje framställning användes 342 g sukros, vilket medförde ett utbyte på 14,2 % för mutan och 10,3 % för alternan. Disackariden sukros består av monosackariderna glukos och fruktos, som har lika molmassor. Mutan och alternan byggs dock endast upp av länkade glukosmolekyler, vilket är varför endast 171 g sukros tas med i beräkningarna för utbytet i respektive framställning.

4.1.1 Rening samt verifiering av enzymer

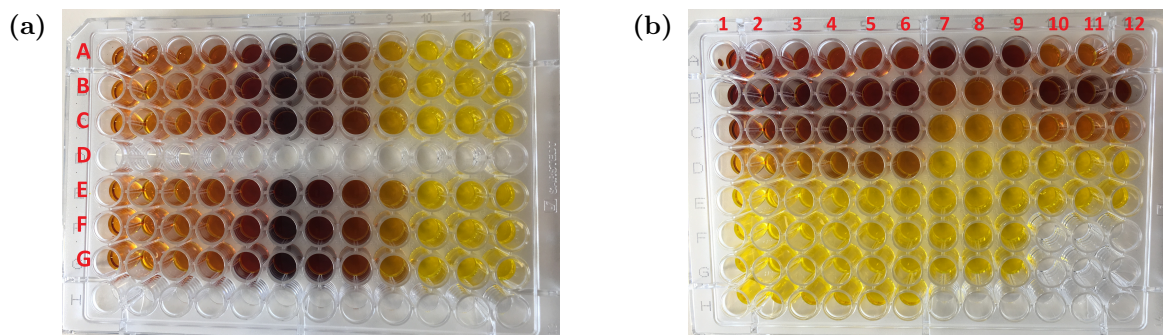
Efter enzymreningen av GtfJ samt GtfL med IMAC-kolonner användes SDS-PAGE för att verifiera att enzymerna renats fram från blandningen. Resultatet från SDS-PAGE presenteras i Figur 2. I den går det att avläsa att mer GtfL (kolumn 8) har renats fram jämfört med GtfJ (kolumn 4). Mängden GtfJ bedömdes emellertid vara tillräcklig, baserat på tidigare utfört magisterarbete vid Institutionen för Biologi och bioteknik på Chalmers Tekniska Högskola under 2017/2018 [34].



Figur 2: Resultat från SDS-PAGE. Siffrorna representerar de olika brunnarna, vilka innehöll: 1: Proteinstege, 2: GtfJ flowthrough (det som inte haft affinitet för pärlorna), 3: GtfJ tvätt, 4: GtfJ protein, 5: GtfJ “borde vara tom”, 6: GtfL flowthrough, 7: GtfL tvätt, 8: GtfL protein.

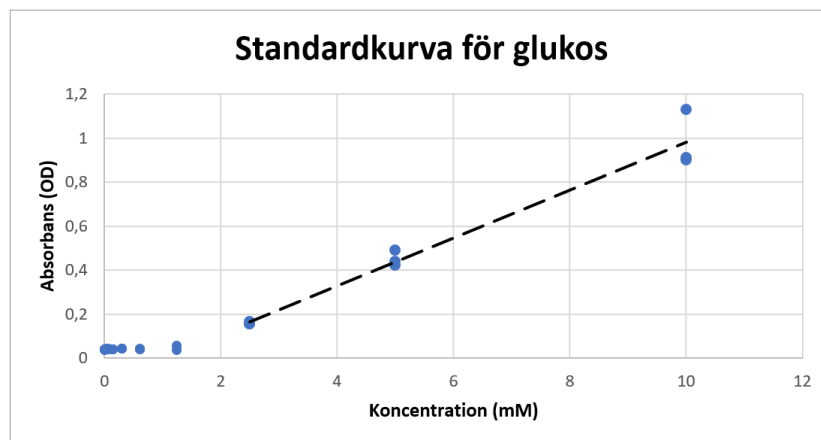
4.1.2 Mätning av reducerande ändar

Resultat från ett urval av DNS-analyserna presenteras i Figur 3. Ju mörkare färg provet har, desto fler reducerande ändar fanns kvar i provet. Alla centrifugeringsprov hade en trend där koncentrationen av reducerande ändar ökade efter varje centrifugering fram till och med centrifugering 6; därefter minskade istället koncentrationen för varje centrifugering.



Figur 3: Resultat från DNS-analyser. a) Rad A-C visar tre replikat från de tolv supernatantproven från tredje centrifugeringssatsen, i ordning så att provet från sista centrifugeringen ligger längst till höger i bild. Rad E-G visar tre replikat från de tolv supernatantproven från fjärde centrifugeringssatsen, i ordning så att provet från sista centrifugeringen ligger längst till höger i bild. b) Kolumn 1-3 visar tre replikat från tredje centrifugerade citratbuffertsatsen, med supernatantprov från femte centrifugeringen längst upp och följande centrifugeringar under i ordningsföljd. Kolumn 4-6 visar tre replikat från fjärde centrifugerade citratbuffertsatsen, med supernatantprov från femte centrifugeringen längst upp och följande centrifugeringar under i ordningsföljd. Kolumn 7-9 visar tre replikat till standardkurvan. Kolumn 10-12 visar prov från de filtrerade proven, där översta raden visar sats 2 innan filtrering, andra raden ovanifrån visar sats 2 i mitten av filtreringen, tredje raden ovanifrån visar sats 3 innan filtrering, fjärde raden ovanifrån visar sats 3 efter filtrering och femte raden ovanifrån visar sats 4 efter filtrering.

Med hjälp av spektrofotometerresultat för kolumn 7-9 i Figur 3b skapades en standardkurva, se Figur 4. Regression utfördes över replikatens linjära område (svart streckad linje), för att fastställa maximalt accepterad koncentration av reducerande ändar. Den maximalt accepterade koncentrationen sattes till 1 mM. Samtliga prov hade lägre koncentration reducerande ändar än 1 mM efter att ha filtrerats eller centrifugerats klart.



Figur 4: Standardkurva för glukos med tre replikat. Svart streckad linje är en regressionslinje över replikatens linjära område. Maximalt accepterad koncentration av reducerande ändrar bestämdes utifrån standardkurvan till 1 mM.

Utifrån standardkurvan i Figur 4, samt bilderna på proven för standardkurvan i Figur 3b, syns att första helt gula provet bör ligga på gränsen för accepterad koncentration av reducerande ändrar. För att vara säker på att ligga under 1 mM reducerande ändrar togs därför beslutet att centrifugera två extra gånger efter gult prov, totalt tolv gånger. I Figur 3a syns tre helt gula prov från de tre sista centrifugeringarna. Att prov, när de centrifugerats färdigt, ligger utanför det linjära området innebär att det inte går att säga exakt vilken koncentration av reducerande ändrar provet har; endast att nivån ligger under den maximalt accepterade.

4.2 Odling av mikroorganismer

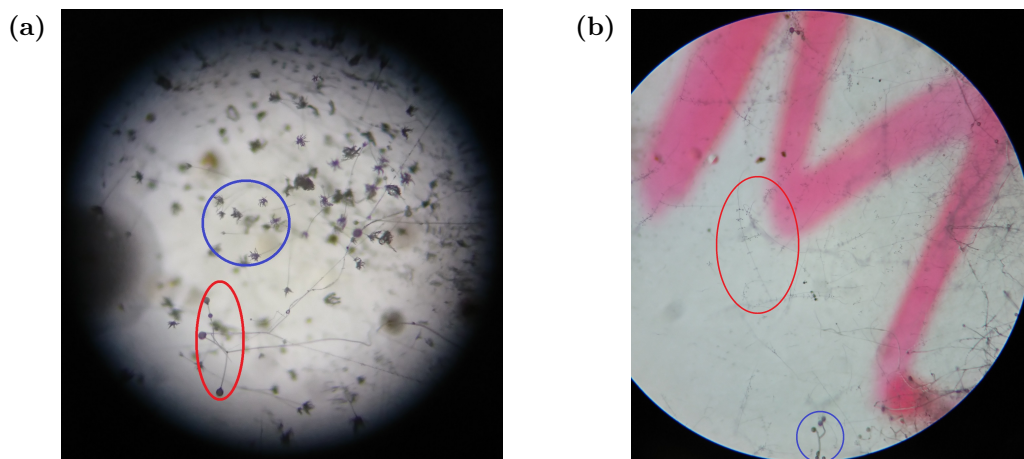
Runt 200 plattor per polysackarid framställdes. Insamlingen av prov resulterade i prov från 15 olika naturmiljöer vid första fältarbetet och 13 olika naturmiljöer vid andra fältarbetet. Prov från ytterligare tre miljöer togs från ett häststall. Resultat från odlingen av proverna på agar-, mutan- och alternanplattor presenteras i Bilaga B. Ingen tillväxt noterades på odlingsplattorna i anaerob miljö och endast en platta hade tillväxt i 4 °C. Tillväxt noterades med allt från en koloni till flera hundra kolonier per platta. Både tydliga bakteriekolonier med en rund form i olika färger, samt olika typer av svampar med både mycel och sporer, observerades. Endast de prov som uppvisade en klar zon återströks; dessa presenteras i Tabell 1. Flera återstrykningar från samma platta gjordes i vissa fall, om det fanns fler än en koloni som uppfyllde kriterierna. Att återstrykningarna kommer från samma ursprungliga platta innebär dock inte nödvändigtvis att det är samma organism. Ofta krävdes flera återstrykningar per platta för att isolera varje enskild koloni. Exempelvis kan det avläsas i Tabell 1 att tre återstrykningar utfördes av platta 10A för att försöka isolera alla kolonier av intresse.

Tabell 1: Återstrukna prov med ursprungsplatta samt information kring tillväxt och om tillväxten i fråga hade en klar zon.

Nr.	Återstruken från platta nr.	Mutan (A)		Alternan (B)		Agar (C)
		Tillväxt	Klar zon	Tillväxt	Klar zon	Tillväxt
R1	7A	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
R2		Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
R3		Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
R4	10A	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
R5		Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
R6		Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
R7	26B	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
R8	27A	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
R9		Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
R10		Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
R11		Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
R12	30A	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
R13		Ja	Nej	Nej	Nej	Nej
R14	39A	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
R15		Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
R16	47A	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
R17	50A	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
R18	51A	Ja	Ja	Ja	Ja	Nej
R19		Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
R20		Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
R21	59A	Ja	Ja	Ja	Ja	Nej
R22		Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
R23		Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
R24		Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
R25	59B	Ja	Nej	Ja	Ja	Ja
R26	62B	Ja	Nej	Ja	Ja	Nej
R27	102B	Nej	Nej	Ja	Ja	Nej

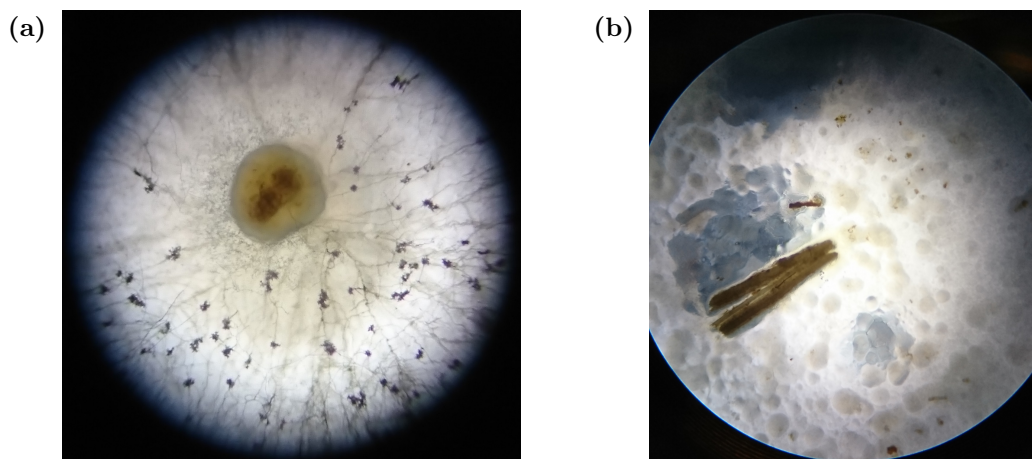
4.2.1 Mikroskopyanalys

Inom två veckor noterades tydlig tillväxt på flera plattor, vilka sedan studerades under mikroskop för ytterligare analys. Två mikroskopbilder av olika områden på platta 50A visualiseras i Figur 5. Kolonier av vad som tycktes vara tre olika arter uppmärksammades; två ur Figur 5a och en ur Figur 5b. De två (troligtvis) olika arterna i Figur 5a särskiljs på topparna som antar antingen bollform (inringade i rött) eller garnnystanform (inringade i blått). Den tredje möjliga arten i Figur 5b (inringad i rött) är mycket mindre än de tidigare två föreslagna arterna (inringade i blått).



Figur 5: Mikroskopanalys av platta 50A med 50x förstoring. a) Troligtvis två olika arter, förmodligen svampar, särskiljs på antingen bollform (inringad i rött) eller garnnystanform (inringad i blått). b) Något mindre förstoring av en tredje möjlig art (inringad i rött); mycket mindre än de två föreslagna arterna i (a) (inringade i blått). Det röda M:et i bilden kommer från en märkpenna.

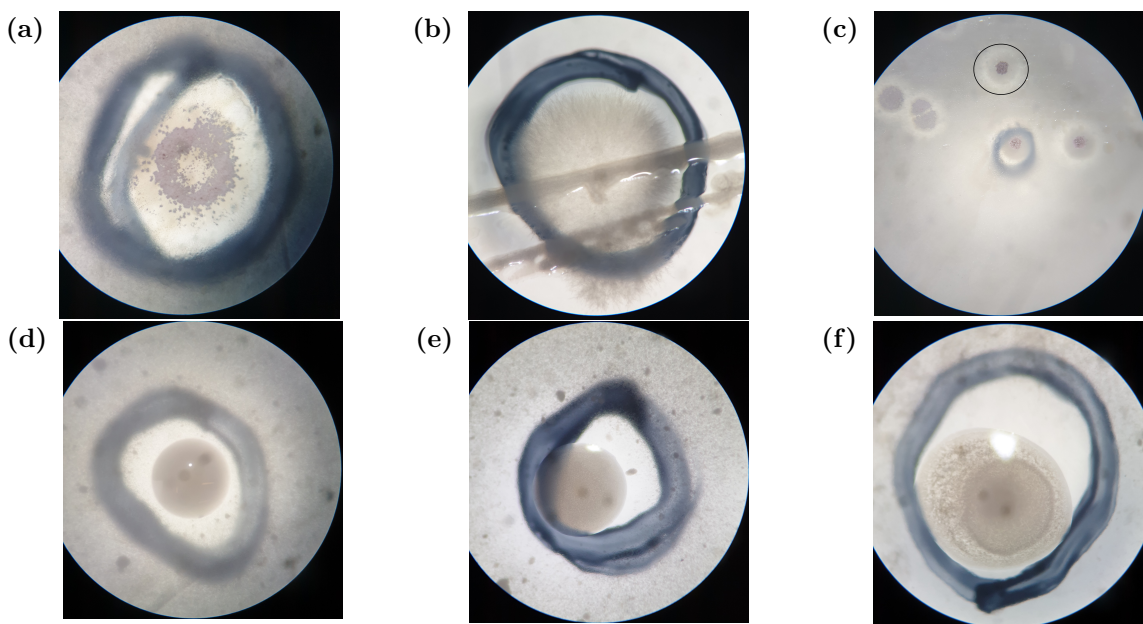
Mikroskopbilder från ytterligare två plattor, platta 62B samt platta 102B, visas i Figur 6. Figur 6a är troligtvis även det en svampart. Figur 6b skulle kunna vara någon form av bakteriekoloni och bedömdes sannolikt vara enklare att separera, odla upp samt analysera än en svamp.



Figur 6: Mikroskopbilder på växande arter från platta 62B samt 102B med 50x förstoring. a) Platta 62B; troligen svamp. b) Platta 102B; eventuellt någon form av bakteriekoloni.

4.2.2 Tillväxt i flytande medium

Plattorna R9A, R16A, R17A, R25B, R26B och R27B från Tabell 1 valdes ut för inokulering i flytande medium då de hade tydliga klara zoner och distinkta kolonier. Mikroskopbilder av de valda kolonierna från plattorna redovisas i Figur 7. Alla kolonier som valdes är markerade med en tjockare handritad ring, förutom i Figur 7c där det är den övre digitala markeringen som visar vald koloni. I bilderna syns vissa utseendemässiga olikheter mellan de valda kolonier, detta resultat var en faktor som spelade roll vid beslut av vilka kolonier som skulle inokuleras då projektet gärna såg att olika typer av organismer gick vidare i processen.



Figur 7: Mikroskopbilder av utvalda kolonier för inokulering. Alla bilder är tagna med 50x förstoring förutom (c), som är tagen med mellan 20-30x förstoring. I (c) är det den digitala, svarta ringen som visar vald koloni. Notera den tydligt klara zonen runt samtliga kolonier. De tjocka, blåa ringarna i bilderna kommer från en märkpenna. a) Inokulerad koloni från platta R27B. b) Inokulerad koloni från platta R17A. c) Inokulerad koloni från platta R26B. d) Inokulerad koloni från platta R9A. e) Inokulerad koloni från platta R25B. f) Inokulerad koloni från platta R16A.

När tillväxt noterats i de inokulerade proven förbereddes nya odlingsplattor för återstrykning, med avsikt att säkerställa att de organismer som odlades i flaskorna verkligen var de som brutit ned polysackariderna på plattorna. Noterad tillväxt i flytande medium samt vid återstrykning på mutan- eller alternanplatta från inokulerade kolonier redovisas i Tabell 2. Där syns att alla inokuleringar hade tillväxt i LB-medium, samt att alla förutom R26B hade klara zoner vid återstrykning på platta. Resultatet låg till grund för vilka prov som skickades iväg för sekvensering.

Tabell 2: Tillväxt vid inokulering.

Flytande medium	Inokulering	Tillväxt i flaska	Tillväxt på platta	Klar zon
LB	R27B	Ja	Ja	Ja
	R17A	Ja	Ja	Ja
	R26B	Ja	Nej	Nej
	R9A	Ja	Ja	Ja
	R25B	Ja	Ja	Ja
	R16A	Ja	Ja	Ja
M9-Mutan	R27B	Nej	Nej	Nej
	R17A	Ja	Ja	Ja
	R26B	Ja	Nej	Nej
	R9A	Nej	Nej	Nej
	R25B	Nej	Nej	Nej
	R16A	Ja	Ja	Ja
M9-Alternan	R27B	Ja	Ja	Ja
	R17A	Nej	Nej	Nej
	R26B	Nej	Nej	Nej
	R9A	Nej	Nej	Nej
	R25B	Nej	Nej	Nej
	R16A	Nej	Nej	Nej

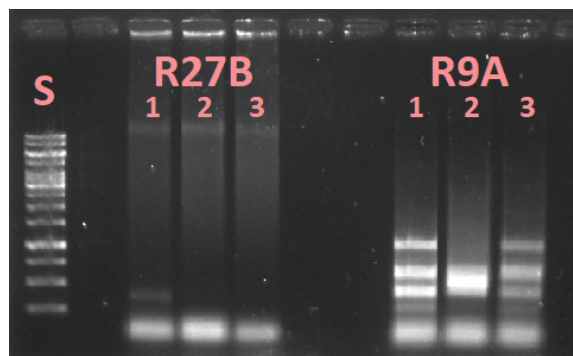
4.3 Sekvensering av mikroorganismer

Alla inokulerade prov valdes ut för sekvensering förutom R26B; detta då ingen klar zon observerades vid återstrykning på odlingsplatta för det provet. Inledningsvis redovisas resultat från provförberedelser inför sekvensering av mikroorganismerna och därefter presenteras sekvenseringsresultaten.

4.3.1 Provförberedelse inför sekvensering

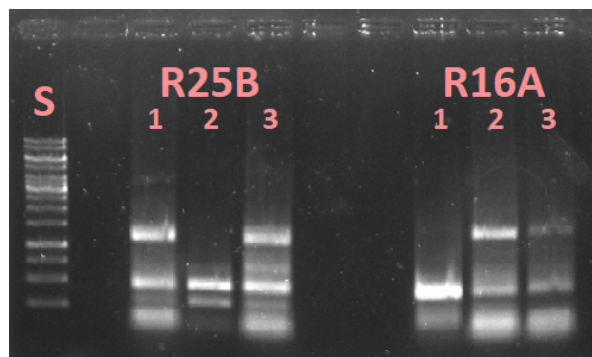
Ett initialt test av PCR-metodiken med ITS-primers utfördes på R16A och R17A, eftersom dessa prov uppvisade tydligast klara zoner på återstrykningsplattor efter inokulering. Testet resulterade i flera band för R16A, men endast ett band i botten för R17A med så kallade "primer dimers"; små icke-specifika biprodukter från PCR-reaktionen som inte är av intresse för projektet [35]. Utifrån detta drogs slutsatsen att PCR-metodiken fungerade, men att prov R17A inte behövde köras igen i nästa PCR-reaktion med ITS-primers. Inför sekvensering genomfördes gelelektrofores i tre replikat från varje platta, varefter synliga band skars ut och placerades i separata provrör. De band som syns längst ner i varje gelelektrofores är primer dimers. Resultatet från gelelektrofores på prov R27B samt R9A vid ITS-sekvensering presenteras i Figur 8. Endast de starkaste banden i varje kolumn skars ut från gelen. Inga band skars ut från kolumn

R27B1, R27B2 och R27B3. Tre band skars ut från kolumn R9A1 samt R9A3 vardera. Ett band skars ut från kolumn R9A2.



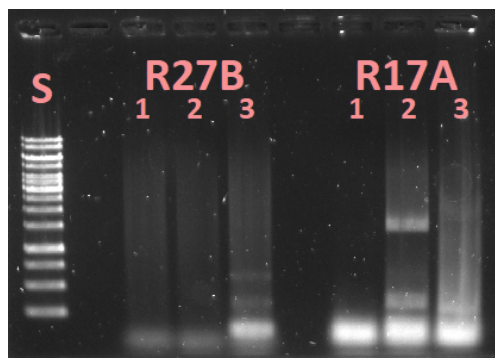
Figur 8: Resultat från gelelektrofores på ITS-sekvenserade mikroorganismer från plattor R27B samt R9A. Kolumn S är en DNA-stege. Kolumn R27B(1-3) är tre replikat från platta R27B. Kolumn R9A(1-3) är tre replikat från platta R9A.

Resultatet från gelelektrofores på prov R25B samt R16A för ITS-sekvensering presenteras i Figur 9. Två band skars ut från var och en av kolumn R25B1, R25B3, R16A2 samt R16A3. Ett band skars ut från kolumn R25B2 respektive R16A1.



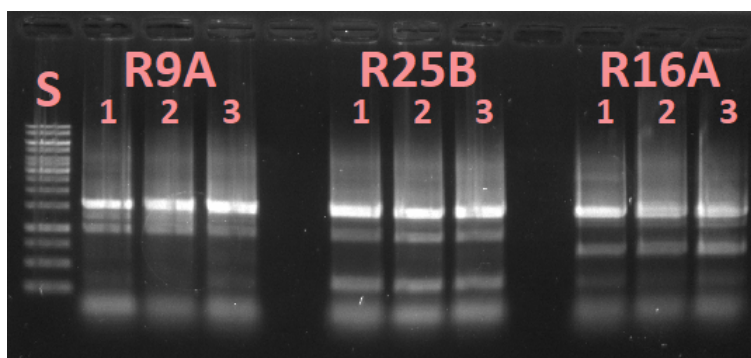
Figur 9: Resultat från gelelektrofores på ITS-sekvenserade mikroorganismer från plattor R25B samt R16A. Kolumn S är en DNA-stege. Kolumn R25B(1-3) är tre replikat från platta R25B. Kolumn R16A(1-3) är tre replikat från platta R16A.

Resultatet från gelelektroforesen på prov R27B samt R17A för 16S-sekvensering presenteras i Figur 10. Inga band skars ut från kolumn R27B1, R27B2, R27B3, R17A1 eller R17A3. Två band skars ut från kolumn R17A2.



Figur 10: Resultat från gelelektrofores på 16S-sekvenserade mikroorganismer från plattor R27B samt R17A. Kolumn S är en DNA-stege. Kolumn R27B(1-3) är tre replikat från platta R27B. Kolumn R17A(1-3) är tre replikat från platta R17A.

Resultatet från gelelektrofores på prov R9A, R25B samt R16A för 16S-sekvensering presenteras i Figur 11. Tre band skars ut från var och en av kolumn R9A1, R25B1, R25B2, samt R25B3. Två band skars ut från var och en av kolumn R9A3, R16A1, R16A2 samt R16A3. Ett band skars ut från kolumn R9A2.



Figur 11: Resultat från gelelektrofores på 16S-sekvenserade mikroorganismer från plattor R9A, R25B samt R16A. Kolumn S är en DNA-stege. Kolumn R9A(1-3) är tre replikat från platta R9A. Kolumn R25B(1-3) är tre replikat från platta R25B. Kolumn R16A(1-3) är tre replikat från platta R16A.

För att ta reda på vilka band som hade tillräckligt hög koncentration (5 ng/μL) för att sändas iväg till Eurofins analyserades banden med hjälp av en nanodrop-spektrofotometer. För att skilja på de fall där flera band skurits ut från samma kolumn lades ytterligare en siffra till i slutet vid beteckningen av provet. Översta bandet i kolumnen fick siffran 1, därefter numrerades eventuella band under i stigande ordning. Bandens koncentrationer redovisas i Tabell 3. Sammanlagt kunde fjorton prov skickas in för sekvensering och de prov som valdes ut är markerade med “*”.

Tabell 3: Vikter uppmätta med nanodrop-spektrofotometer inför 16S- och ITS-sekvensering. “*” indikerar att provet sändes in för sekvensering.

Metod	Band nr.	Koncentration [ng/μL]	Band nr.	Koncentration [ng/μL]
ITS	R9A1.1	1,3	R25B2.1	3,6
	R9A1.2 *	5,2	R25B3.1	3,4
	R9A1.3 *	12,1	R25B3.2 *	12,4
	R9A2.1 *	11,7	R16A1.1	7,0
	R9A3.1	1,7	R16A2.1	4,3
	R9A3.2	6,3	R16A2.2 *	7,8
	R9A3.3	6,4	R16A3.1	1,0
	R25B1.1	3,3	R16A3.2	2,0
	R25B1.2	3,9	-	-
16S	R17A2.1	1,0	R25B2.2 *	8,2
	R17A2.2	2,4	R25B2.3 *	20,3
	R9A1.1 *	8,6	R25B3.1	10,5
	R9A1.2	2,9	R25B3.2	1,3
	R9A1.3 *	10,3	R25B3.3	1,9
	R9A2.1	7,6	R16A1.1	21,7
	R9A3.1	8,6	R16A1.2	3,5
	R9A3.2 *	16,6	R16A2.1	8,8
	R25B1.1	9,0	R16A2.2	4,6
	R25B1.2	3,8	R16A3.1 *	23,1
	R25B1.3	2,6	R16A3.2 *	5,0
	R25B2.1 *	12,5	-	-

4.3.2 Analys av sekvenseringsresultat

Endast en del av de prov som sändes in för sekvensering gav resultat. En del resultat bestod dock endast av sekvensering från antingen framåt- eller bakåtriktad primer, vilket gör sekvenseringen mindre tillförlitlig jämfört med om den analyserats i båda riktningar. De flesta proven gav inget resultat; möjliga anledningar till att sekvenseringen misslyckades diskuteras i avsnitt 5.2.3. I Figur 12 följer exempel på en lyckad samt en misslyckad sekvensering. Figur 12a visar lyckad sekvensering av prov R9A1.3 med den framåtriktade primern medan Figur 12b visar misslyckad sekvensering av prov R9A1.3 med den bakåtriktade primern. Flera toppar som representerar en bas, som i Figur 12b, innebär att sekvenseringen inte fungerat; eventuellt på grund av att flera olika DNA-sekvenser sänts in i samma provrör.



Figure 12: Del av kromatogram från sekvensering av prov R9A1.3. a) Kromatogram från lyckad sekvensering med framåtriktad primer, där en topp motsvarar en bas. b) Kromatogram från misslyckad sekvensering med bakåtriktad primer, där flera olika toppar syns för en bas.

Resultat från samtliga prov som sänts in och utvärderats med ITS- respektive 16S-sekvensering visas i Tabell 4 respektive Tabell 5. Förkortningen “fwd” står för framåtriktad primer och “rev” står för bakåtriktad primer. Samtliga prov som sändes iväg för sekvensering togs från inokulering i LB-medium. För samtliga prov låg e.v. på 0, vilket innebär att det inte är en slumpmässig matchning. De prov som inte kunde sekvenseras har markerats med “-” i tabellerna. Då två sekvenser anses tillhöra samma art om p.i. överstiger 97 % kan resultatet från ITS-sekvenseringen indikera förekomsten av svampar tillhörande arten *Brettanomyces Bruxellensis*; en typ av jästsvamp som idag främst används för framställning av alkoholhaltiga drycker så som öl och vin [36]. Dock är det inte ett helt tillförlitligt resultat då ingen sekvensering med den bakåtriktade primern kunde utföras. Vidare visar ITS-sekvenseringen trolig förekomst av släktet *Cladosporium*, som är ett globalt förekommande släkte av mögelsvampar som bland annat återfinns som parasiter på döda eller döende växtdelar [37].

Tabell 4: Resultat från ITS-sekvensering.

Nr.	fwd p.i.	rev p.i.	Provets ursprung	Bästa matchning
R9A1.2	-	-	Skatås, barrskog, förmultnat träd, mutan, 37 °C	-
R9A1.3	98,82 %	-	Skatås, barrskog, förmultnat träd, mutan, 37 °C	<i>Brettanomyces bruxellensis</i> culture CBS:2796
R9A2.1	-	96,84 %	Skatås, barrskog, förmultnat träd, mutan, 37 °C	<i>Cladosporium</i> sp. strain ISK3_12
R25B3.2	-	-	Skatås, lövskog, jordprov, alternan, 37 °C	-
R16A2.2	-	-	Skatås, gräsmark, jordprov, mutan, 37 °C	-

Samtliga inskickade prov från 16S-sekvenseringen som gav något resultat visade bästa matchningar med arter tillhörande släktet *Paenibacillus*. Bakteriesläktet återfinns i flera olika miljöer; däribland jord, färskvatten, saltvatten, sediment och på växter. *Paenibacillus* har även tidigare påvisat sig kunna producera mutanas och andra nedbrytande enzym, tex amylas [38]. Dock visade inga av proven tillräckligt högt p.i. på både den framåt- och bakåtriktade primern för att tillförlitligt kunna indikera tillhörighet till

en matchad art. För R16A3.1 i Tabell 5 visade både framåt- och bakåtriktad primer att mikroorganismen verkar tillhöra släktet *Paenibacillus*. Den framåtriktade primern visade dock att mikroorganismen till 95,72 % liknar stammen *TB.5S5* medan den bakåtriktade primern visade att den till 97,74 % liknar stammen *CH-60*; detta åskådliggörs i tabellen med ett snedstreck.

Tabell 5: Resultat från 16S-sekvensering.

Nr.	fwd p.i.	rev p.i.	Provets ursprung	Bästa matchning
R9A1.1	97,64 %	-	Skatås, barrskog, förmultnat träd, mutan, 37 °C	<i>Paenibacillus</i> sp. strain VV-0-L
R9A1.3	-	-	Skatås, barrskog, förmultnat träd, mutan, 37 °C	-
R9A3.2	-	-	Skatås, barrskog, förmultnat träd, mutan, 37 °C	-
R25B2.1	96,49 %	-	Skatås, lövskog, jordprov, alternan, 37 °C	<i>Paenibacillus</i> sp. strain VV-0-L
R25B2.2	-	-	Skatås, lövskog, jordprov, alternan, 37 °C	-
R25B2.3	-	-	Skatås, lövskog, jordprov, alternan, 37 °C	-
R16A3.1	95,72 %	97,74 %	Skatås, gräsmark, jordprov, mutan, 37 °C	<i>Paenibacillus</i> <i>taichungensis</i> strain <i>T.B5S5/CH-60</i>
R16A3.2	-	93,90 %	Skatås, gräsmark, jordprov, mutan, 37 °C	<i>Paenibacillus xylanex-</i> <i>edens</i> strain PAMC 22703

5 Diskussion

Avsnittet inleds med att projektets metodik diskuteras tillsammans med eventuella ändringar som kan göras i framtiden med avseende på den valda metoden. Därefter diskuteras erhållna resultat, samt vad som kan ha påverkat dessa. Slutligen diskuteras eventuella framtida studier, med utgångspunkt i de resultat som erhållits i projektet.

5.1 Val av metod

Vid rening av polysackariderna är centrifugering en vanligt förekommande metod för att bli av med oönskade komponenter. Metoden är dock mycket tidskrävande för större volymer då den behöver tillämpas i flera omgångar för att uppnå önskad renhet. Dessutom kan metoden, på grund av att supernatanten kasseras, även resultera i ett minskat utbyte om pelleten efter centrifugering inte är fast nog. På grund av detta undersöktes möjligheten att filtrera polysackariderna istället. Alternan fungerade mycket bra att filtrera och de resultat som erhöles därifrån var mycket bättre än de som erhöles från centrifugering av polysackariden. Alternan renades därför i resten av projektet genom filtrering. Filtring var dock inte en fungerande metod för rening av mutan, då polysackariden bildade ett mycket kompakt lager ovanpå filtret och därmed inte släppte igenom vattnet. Mutan fick istället renas med hjälp av centrifugering. Polysackaridernas olika framställningsmetoder gör det svårt att på ett tillförlitligt sätt jämföra enzymernas produktionsförmåga med hjälp av utbytet, eftersom de olika metoderna kan ha haft en inverkan på hur mycket polysackarid som kunnat framställas. Dock var det inte själva utbytet som var av främsta intresse i projektet, vilket innebär att användning av två olika reningsmetoder inte utgjorde något större problem.

Under provinsamling i olika naturmiljöer utfördes arbetet med agar-, mutan- respektive alternanplattorna inte sterilt, vilket innebär att det fanns risk för kontaminering av exempelvis luftburna sporer. För projektet var syftet att få tillväxt av mikroorganismer med förmåga att bryta ned polysackariderna; något som var oberoende av var exakt mikroorganismerna kom ifrån. Därmed utgjorde den icke-sterila miljön inget problem för projektet; dock innebär det att det egentliga ursprunget för en växande koloni är osäkert, vilket kan innebära problem i framtiden om den verkliga ursprungsmiljön ska undersökas. För att undvika kontaminering skulle prov kunna samlas in i naturen men introduceras till odlingsplattorna i steril miljö först senare i laboratoriet. Kategorisering av odlingsplattor från olika tillväxtkriterier gjordes i slutet av projektet, vilket dessvärre innebär att flera av plattorna hade torkat ut. Således försvårades i sin tur bedömningen av huruvida det hade vuxit på plattorna eller inte. Ett förslag på justering i arbetssättet för framtida studier är att påbörja kategoriseringen av plattor tidigare i projektet, för att undvika liknande svårigheter.

5.2 Erhållna resultat

Nedan diskuteras erhållna resultat från framställningen av polysackariderna mutan och alternan. Även tillväxten av mikroorganismer, samt sekvenseringsresultaten från proven, diskuteras.

5.2.1 Polysackaridframställning

Utifrån analys med SDS-PAGE kan slutsatsen dras att mer GtfL än GtfJ erhöles efter initial rening på IMAC-kolonn, se avsnitt 4.1.1 Figur 2. Utifrån observationer gjorda under enzymbildningen syntes även att polysackarider bildades fortare av GtfL än av GtfJ; detta genom att vätskan i behållarna med GtfL blev grumlig i snabbare takt. Då båda enzymen placerades i 30 °C noterades också att GtfJ-lösningen blev grumlig ännu fortare än GtfL-lösningen, vilket tyder på att GtfJ kan vara mer temperaturberoende än GtfL.

Vid centrifugering borde polysackariderna bli renare efter varje omgång, i och med att antalet glukos- och fruktosmolekyler bör minska. Dock visade DNS-analysen av mutan en annan trend där halten glukos- och fruktosmolekyler först ökade fram tills sjätte centrifugeringen, för att sedan minska, se avsnitt 4.1.2 Figur 3a. Inledningsvis var en hypotes som undersöktes i projektet att den citratbuffert som användes vid tillverkningen av mutan och alternan kunde ha påverkat DNS-analysen i början av centrifugeringen och att provet därför fick en ljusare färg än det skulle ha fått utan buffert. För att undersöka hypotesen genomfördes resuspenderingar för mutan med citratbuffert istället för vatten för att se om provet fick en ljusare färg än de som resuspenderades med vatten; resultatet åskådliggörs i avsnitt 4.1.2, Figur 3b. Resultatet från DNS-analysen visade att citratbufferten inte verkade ha någon inverkan på provets färg, vilket innebär att det är något annat som orsakar den observerade trenden. Slutresultatet för alla analyser visade dock att vad det än var som inledningsvis störde analysen så hade det ingen inverkan mot slutet av centrifugeringen; efter tolv genomförda centrifugeringar innehöll proven en minskad mängd reducerande ändrar och ansågs därmed tillräckligt rena från glukos- och fruktosmolekyler.

Eftersom sukros inte innehåller några reducerande ändrar kan mängden av dessa molekyler inte visualiseras i en DNS-analys. Då sukros var utgångsmaterialet för enzymerna vid polysackaridframställningen kan det ha funnits kvar sukros i proven efter rening. Det innebär att det kan ha funnits tillräckligt med sukros kvar i proven för mikroorganismer att använda som kolkälla i senare försök. Då bevis finns för att glukos och fruktos har renats bort från proven är det ändå troligt att även sukros har renats bort, dock i okänd mängd. I de prov som sedan inokulerades syntes en klar zon runt kolonierna; något som indikerar att mikroorganismerna i kolonierna har brutit ned just polysackariderna, vilka annars gav plattorna en vit färg. I framtida studier kan det vara aktuellt att kontrollera

polysackaridernas renhet med en annan analysmetod, exempelvis masspektrometri, för att säkerställa att inga signifikanta mängder sukros finns kvar.

5.2.2 Tillväxt av mikroorganismer

Resultat från Tabell 1 i avsnitt 4.2 visar att tillväxten på de ursprungliga odlingsplattorna till stora delar skedde med mutan som kolkälla, då endast 4 av de 13 plattorna (31 %) som valdes ut för återstrykning kommer från en platta innehållande alternan. Resultatet speglas i originalproven från Bilaga B, men då med ännu mindre andel plattor som endast visade tillväxt på alternan (18 %). Sammantaget tyder resultaten starkt på att det återfunnits fler mikroorganismer med förmåga att bryta ned mutan än med förmåga att bryta ned alternan.

Anledningar till att mutan är lättare att bryta ned kan vara det faktum att glukosmolekylerna i mutan är sammanlänkade på samma sätt (med α -1,3-bindningar) genom hela polysackariden; således krävs endast att enzymet kan bryta ned en typ av bindning. Enzymer som bryter ned alternan behöver kunna bryta ned både α -1,3- och α -1,6-bindningar vilket kräver ett enzym med mer komplex funktion jämfört med mutanaser, alternativt två olika enzymer som kan bryta ned varsin bindningstyp. Mer komplexa enzymer skulle kunna vara ovanligare att finna i flera olika arter i naturen, vilket skulle kunna förklara varför det återfunnits fler mikroorganismer som kan växa på mutan än på alternan. Det kan även vara så att de mikroorganismer som vuxit på alternan lever i symbios med varandra, där en av organismerna kan bryta ned α -1,3-bindningar medan den andra kan bryta ned α -1,6-bindningar. Kombinationen av två mikroorganismer är inte alltför trolig, men genom symbiosen skulle det kunna förekomma tillväxt på alternanplattorna utan att det finns ett enskilt enzym som kan bryta ned polysackariden i fråga. Detta behöver dock inte vara ett negativt forskningsresultat; även kombinationen av två enzymer skulle kunna användas i kommersiella produkter för att motverka plack.

Vid analys av de odlingsförhållanden som tillväxtplattorna med klar zon befunnit sig i syns det att majoriteten av dem vuxit i antingen rumstemperatur eller i 37 °C. Endast en platta har vuxit med klar zon i 4 °C, samtidigt som inga plattor har vuxit alls under anaeroba odlingsförhållanden. Mikroorganismerna hittades i prov från jord och vatten i naturen där det finns syre, vilket gör att det inte är förvånande att de har svårt att växa anaerobt. Värme brukar till en gräns normalt innebära ökad bakterietillväxt; att mikroorganismerna i projektet växte bäst i rumstemperatur eller 37 °C är därför inte heller överraskande. Med tanke på att människans orala miljö har en temperatur kring 37 °C är projektets resultat positivt då enzymerna temperaturmässigt även borde kunna bryta ned mutan och alternan i munhålan. Eftersom projektet inte lyckades utvinna några enzymer ur mikroorganismerna är det dock svårt att säga om det är mikroorganismerna eller enzymerna som fungerar bäst i rumstemperatur respektive 37 °C; därmed hade vidare studier behövts för att kunna dra slutsatser kring detta.

5.2.3 Sekvensering

Vid analys av kolonierna från inokuleringsflaskorna via gelelektrofores observerades fler än ett band för flera prov, se Figur 8, Figur 9 och Figur 10 i avsnitt 4.3.1. Anledningen till att flera band uppkommit kan vara att det kan ha funnits fler än en organism i inokuleringsflaskan, eller att de primers som användes vid sekvenseringen även bundit in till sekvenser som är tillräckligt lika ITS- respektive 16S-regionerna. Då det troligtvis hittats fler än en art i flera av inokuleringsflaskorna (se Tabell 4 och Tabell 5 i avsnitt 4.3.2) är det förstnämnda förslaget ett troligare alternativ.

Resultat från ITS-sekvenseringen tyder på att det troligtvis är arten *Brettanomyces bruxellensis* som vuxit på platta R9A. Arten borde därmed kunna producera enzymer som bryter ned mutan. Det ursprungliga provet som lade grunden för senare inokulering av arten togs i Skatås från ett förmultnat träd (platta 27A), vilket är förenligt med den förväntade levnadsmiljön för jästsvampen. Som redan nämnts är resultatet dock inte helt tillförlitlig då provet enbart kunnat sekvenseras med en framåtriktad primer. På platta R9A återfanns även bakterier tillhörande släktet *Paenibacillus*, vilket gör att det inte med säkerhet går att säga vilken av mikroorganismerna som egentligen har förmågan att tillverka det intressanta enzymet. Dock kan det konstateras att båda mikroorganismerna har vuxit med mutan som kolkälla och därmed borde någon av dem definitivt kunna syntetisera ett eller flera enzymer som kan bryta ned polysackariden. Även en tredje mikroorganism, möjligtvis från släktet *Cladosporium*, återfanns på platta R9A. Vidare studier behövs för att analysera om det är en, två eller alla tre mikroorganismer som har förmågan att bryta ned mutan, eller om det handlar om någon form av symbios.

Endast en mikroorganism med förmåga att bryta ned alternan kunde sekvenseras, band R25B2.1. Resultatet därifrån tyder på att mikroorganismen eventuellt tillhör släktet *Paenibacillus* som tidigare visat förmåga att kunna bryta ned både mutan och liknande strukturer [38]. Det är därför möjligt att den sekvenserade organismen är en ny art från det släktet, en art som då kan producera enzymer som bryter ned alternan. Mikroorganismen återfanns ursprungligen i ett jordprov från en barrskog i Skatås (platta 59B) och det stämmer överens med var släktet återfinns. Band R16A3.1 matchade också med *Paenibacillus* men för två olika stammar inom arten *Paenibacillus taichungensis*, för bakåt- och framåtriktade primers. Resultaten för p.i. gör det svårt att dra några klara slutsatser om mikroorganismen i fråga men tillhörighet till släktet är troligt. Trots lyckade sekvenseringar kunde ingen specifik art konstateras med över 97 % p.i. för flera av proven. Anledningar till att vissa mikroorganismer inte har kunnat artbestämmas kan dels vara för misslyckade eller dåliga sekvenseringsresultat, men även att det kan röra sig om en ny och tidigare icke-sekvenserad art. Är det en ny art är det av stort intresse att vidare studera denna för att utforska om dess enzymer går att använda vid behandling av plack, men mer forskning behövs för att fastställa huruvida det över huvud taget handlar om en ny art eller inte.

Sekvenseringsresultaten är baserade på hur väl Eurofins har kunnat sekvensera de in-skickade proven. Alla prov har inte kunnat sekvenseras, vilket kan bero på flera anledningar. Det är ofta problematiskt att bestämma antalet nukleotider korrekt om samma nukleotid förekommer flera gånger i rad, vilket kan leda till en feltolkning av sekvensen [39]. En annan anledning till att vissa prov inte kunnat sekvenseras kan vara att provet som skickades iväg för sekvensering innehöll sekvenser från fler än en art, vilket skulle kunna ge upphov till ett kluster i sekvenseringen likt det i avsnitt 4.3.2, Figur 12b. Att proven kan ha innehållit olika sekvenser kan, som tidigare nämnts, bero på att inokuleringsflaskorna kan ha innehållit fler än en art. Detta kan ha resulterat i att alla nukleotider inte har kunnat sekvenseras, alternativt att de har bestämts felaktigt, vilket i slutändan innebär att en exakt svamp- eller bakterieart inte har kunnat bestämmas. Ytterligare en anledning till att fler arter med säkerhet inte kunnat bestämmas är att databasen nBLAST inte har DNA-sekvenser från alla arter, eller att en art har förekommit i forskning men ännu inte sekvenserats. För att bestämma arter krävs därmed ytterligare analys; exempelvis kan en större mängd DNA renas fram än vad som gjordes i projektet. Ännu ett alternativ är att göra flera upprepade sekvenseringar för fler prov från samma art, vilket ger mer underlag för att korrekt bestämma sekvensen. Även om inte sekvenserna i projektet har varit tillräckligt exakta på artnivå har de dock visat tillräckliga resultat för att bestämma sekvenserna på släktenivå. Många av sekvenseringsresultaten hade ett p.i. på mindre än 97 %, vilket kan vara en indikation på att de arter som sekvenserats i projektet kan vara nya och hittills okända arter. Med tanke på det av stort intresse att vidare isolera och sekvensera de mikroorganismer som inte kunde kategoriseras till en viss art, för att undersöka huruvida det är fel i sekvenseringen eller om det rör sig om nya arter.

5.3 Framtida studier

Då ett delsyfte till projektet, att isolera och karakterisera enzymer från odlade mikroorganismer, inte uppnåddes på grund av tidsbrist är det en tänkbar utgångspunkt för framtida studier; exempelvis kan tagna stamlösningar av de inokulerade proven från projektet användas som utgångspunkt. Då det yttersta målet är att få fram en produkt som kan användas för att motverka plack är det lämpligt att framtida studier även behandlar exempelvis huruvida ett funnet enzym fungerar *in vivo*. Vid sådana studier bör enzymets effektivitet undersökas vidare och det kan även bli aktuellt att undersöka och jämföra olika enzymer för att hitta ett som fungerar optimalt i förhållanden som liknar de i den mänskliga munhålan. Isolerade enzymer skulle även kunna modifieras tills dess att de får optimal funktion.

6 Slutsatser

Projektets huvudsakliga syftet var att hitta nya enzymer, producerade av mikroorganismer, med förmåga att bryta ned polysackariderna mutan och alternan. Då inga nya enzymer har isolerats eller karakteriserats har projektet inte till fullo uppnått det uppsatta syftet; snarare har flera delsyften uppnåtts. Mikroorganismer som kan bryta ned mutan och alternan har kultiverats och till viss del identifierats. Genom tillväxt av mikroorganismer på plattor med mutan eller alternan som kolkälla och därefter isolering av dessa mikroorganismer har kolonier som skapar en klar zon på plattorna isolerats, vilket tyder på att dessa mikroorganismer kan bryta ned mutan eller alternan. Vidare har några av de mikroorganismer som visat tillväxt och klar zon kunnat identifieras till släktena *Brettanomyces*, *Cladosporium* samt *Paenibacillus*. Ingen av de sekvenserade mikroorganismerna hade dock tillräckligt högt p.i. för både framåt- och bakåtriktad primer för att det med säkerhet ska gå att säga att de tillhör en viss art. Detta innebär att de funna mikroorganismerna skulle kunna tillhöra arter som ännu inte hittats och sekvenserats och som kan vara användbara i framtida metoder för behandling av plack.

Från projektet kan det konstateras att det finns en god potential att finna enzymer ute i naturen som kan bryta ned mutan och alternan och därigenom även motverka plackbildning. För vidare studier och för att uppnå projektets syfte är det av intresse att försöka isolera och karakterisera enzymer från de funna mikroorganismerna, samt att därefter undersöka hur de beter sig i *in vivo*-miljöer för att vidare studera dess funktionalitet. Slutligen kan studier genomföras som försöker applicera enzymerna som isolerats i munhygieniska produkter, då det yttersta målet med projektet var att ta fram möjliga produkter för behandling av plack.

Referenser

- [1] Pleszczyńska M, Wiater A, Janczarek M och Szczodrak J. $(1 \rightarrow 3)$ - α -D-glucan hydrolases in dental biofilm prevention and control: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, 79:761–778, 2015. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2015.05.052.
- [2] Shimotsuura I, Kigawa H, Ohdera M, Kuramitsu HK och Nakashima S. Biochemical and molecular characterization of a novel type of mutanase from *Paenibacillus* sp. strain RM1: identification of its mutan-binding domain, essential for degradation of *Streptococcus mutans* biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(9):2759–2765, 2008. DOI: 10.1128/AEM.02332-07.
- [3] Wyckoff HA, Cote GL och Biely P. Isolation and characterization of microorganisms with alternan hydrolytic activity. *Current Microbiology*, 32:343–348, 1996. DOI: 10.1007/s002849900061.
- [4] Nationalencyklopedin. Biofilm, [citerad 2019-02-05]. Tillgänglig från: <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/biofilm>.
- [5] Marsh PD och Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*, 15(3):169–175, 1995. DOI: 10.1007/bf01569822.
- [6] 1177 Vårdguiden. Tandsten, [citerad 2019-05-16]. Tillgänglig från: <https://www.1177.se/skane/sjukdomar--besvar/mun-och-tander/tander/tandsten/>.
- [7] Pleszczyńska M, Wiater A och Szczodrak J. Mutanase from *Paenibacillus* sp. MP-1 produced inductively by fungal α -1,3-glucan and its potential for the degradation of mutan and *Streptococcus mutans* biofilm. *Biotechnology letters*, 32(11):1699–1704, 2010. DOI: 10.1007/s10529-010-0346-1.
- [8] Nationalencyklopedin. Matspjälkning, [citerad 2019-02-11]. Tillgänglig från: <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/matspjälkning>.
- [9] Smith M och Morton DG. The mouth, salivary glands and oesophagus. I: *The Digestive System*, kapitel 2, ss 19–38. Churchill Livingstone, 2 utgåvan, 2010. DOI: 10.1016/B978-0-7020-3367-4.00002-5.
- [10] Nationalencyklopedin. Enzym, [citerad 2019-02-05]. Tillgänglig från: <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/enzymer>.
- [11] Suyotha W, Yano S och Wakayama M. α -1,3-glucanase: present situation and prospect of research. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32(2):30, 2016. DOI: 10.1007/s11274-015-1977-0.
- [12] Stewart PS och Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 6:199, 2008. DOI: 10.1038/nrmicro1838.

- [13] Selwitz RH, Ismail AI och Pitts NB. Dental caries. *The Lancet*, 369:51–59, 2007. DOI: 10.1016/S0140-6736(07)60031-2.
- [14] Murakami S, Mealey BL, Mariotti A och Chapple ILC. Dental plaque-induced gingival conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20):17–27, 2018. DOI: 10.1111/jcpe.12937.
- [15] Fischer LA, Demerath E, Tittner-Eddy P och Costalonga M. Placental colonization with periodontal pathogens: the potential missing link. *American Journal of Obstetrics Gynecology*, [Epub ahead of print], 2019. DOI: 10.1016/j.ajog.2019.04.029.
- [16] Simpson CL, Cheetham NWH och Jacques NA. Four glucosyltransferases, GtfJ, GtfK, GtfL and GtfM, from *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. 141(6):1451–1460, 1995. DOI: 10.1099/13500872-141-6-1451.
- [17] Puanglek S, Kimura S, Enomoto-Rogers Y, Kabe T, Yoshida M, Wada M och Iwata T. *In vitro* synthesis of linear α -1,3-glucan and chemical modification to ester derivatives exhibiting outstanding thermal properties. *Scientific Reports*, 6:30479, 2016. DOI: 10.1038/srep30479.
- [18] Svensk MeSH. Bioprospektering, [citerad 2019-05-08]. Tillgänglig från: <https://mesh.kib.ki.se/term/D065132/bioprospecting>.
- [19] Aime MC, McTaggart AR, Mondo SJ och Duplessis S. Phylogenetics and phylogenomics of rust fungi. I: Jeffrey P. Townsend och Zheng Wang, redaktörer, *Advances in Genetics*, band 100, kapitel 7, ss 267–307. Academic Press, 2017. DOI: 10.1016/bs.adgen.2017.09.011.
- [20] Hao DC, Gu XJ och Xiao PG. Chemical and biological research of *Clematis* medicinal resources. I: *Medicinal Plants*, kapitel 9, ss 341–371. Woodhead Publishing, 2015. DOI: 10.1016/B978-0-08-100085-4.00009-8.
- [21] Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, Coissac E, Taberlet P och Kauserud H. ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BioMed Central Microbiology*, 10(1):189, 2010. DOI: 10.1186/1471-2180-10-189.
- [22] Blaailid R, Kumar S, Nilsson RH, Abarenkov K, Kirk PM och Kauserud H. ITS1 versus ITS2 as DNA metabarcodes for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 13(2):218–24, 2013. DOI: 10.1111/1755-0998.12065.
- [23] Kommedal Ö, Kvella K, Skjåstad R, Langeland N och Wiker HG. Direct 16S rRNA gene sequencing from clinical specimens, with special focus on polybacterial samples and interpretation of mixed DNA chromatograms. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(11):3562–3568, 2009. DOI: 10.1128/JCM.00973-09.

- [24] Butler JM. Non-human DNA. I: *Advanced Topics in Forensic DNA Typing: Methodology*, kapitel 16, ss 473–495. Academic Press, San Diego, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-374513-2.00016-6.
- [25] Schlaberg R, Simmon KE och Fisher MA. A systematic approach for discovering novel, clinically relevant bacteria. *Emerging Infectious Diseases*, 18(3):422, 2012. DOI: 10.3201/eid1803.111481.
- [26] Tindall BJ, Rossello-Mora R, Busse HJ, Ludwig W och Kampfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60(1):249–66, 2010. DOI: 10.1099/ijs.0.016949-0.
- [27] Naturvårdsverket. Plocka blommor, bär, svamp, [citerad 2019-02-07]. Tillgänglig från: <https://www.naturvardsverket.se/Var-natur/Allemansratten/Det-har-galler/Plocka-blommor-bar-svamp/>.
- [28] Länsstyrelsen. Änggårdsbergen, [citerad 2019-03-27]. Tillgänglig från: <https://www.lansstyrelsen.se/vastra-gotaland/besok-och-upptack/naturreservat/anggardsbergen.html>.
- [29] Länsstyrelsen. Delsjöområdet, [citerad 2019-03-27]. Tillgänglig från: <https://www.lansstyrelsen.se/vastra-gotaland/besok-och-upptack/naturreservat/delsjoomradet.html>.
- [30] McKee LS. Measuring enzyme kinetics of glycoside hydrolases using the 3,5-dinitrosalicylic acid assay. I: *Protein-carbohydrate interactions*, band 1588 av *Methods in molecular biology*, ss 27–36. Humana Press, 2017. DOI: 10.1007/978-1-4939-6899-2_3.
- [31] ThermoFisher Scientific, Inc. Thermo scientific genejet gel extraction kit, [citerad 2019-04-11]. Tillgänglig från: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0691>.
- [32] Eurofins Genomics. Tubeseq service - most powerful DNA sequencing, [citerad 2019-04-25]. Tillgänglig från: <https://www.eurofinsgenomics.eu/en/custom-dna-sequencing/eurofins-services/tubeseq-service/>.
- [33] NCBI. Basic local alignment search tool, [citerad 2019-05-05]. Tillgänglig från: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- [34] Seveso A. Investigation of novel α -1,3-glucanase for the degradation of microbial polysaccharides. Examensarbete, Università degli Studi di Milano-Bicocca (i samarbete med Chalmers Tekniska Högskola), 2018.

- [35] Sawyer RH, Glenn TC, French JO och Knapp LW. Developing antibodies to synthetic peptides based on comparative DNA sequencing of multigene families. I: *Methods in enzymology*, band 395 av *Molecular evolution: producing the biochemical data*, ss 636–652. Elsevier, 2005. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)95033-7.
- [36] Smith BD och Divol B. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food Microbiology*, 59:161–75, 2016. DOI: 10.1016/j.fm.2016.06.008.
- [37] Nationalencyklopedin. Sammetmögel, [citerad 2019-05-03]. Tillgänglig från: <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/lång/sammetmögel>.
- [38] Grady EN, MacDonald J, Liu L, Richman A och Yuan ZC. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microbial cell factories*, 15(1):203–203, 2016. DOI: 10.1186/s12934-016-0603-7.
- [39] Treangen TJ och Salzberg SL. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. *Nature Reviews Genetics*, 13(1):36–46, 2011. DOI: 10.1038/nrg3117.

A Medium

M9-medium

- 20 mL 20 %-ig sockerkälla
- 200 mL M9-salt
- 2 mL Magnesiumsulfat
- 100 µL Kalciumklorid

MQ-vatten tillsattes tills totalvolymen nådde 1 L.

M9-salt

- 5 g Ammoniumklorid
- 33 g Natriumfosfat, dibasisk, vattenfri
- 15 g Kaliumdivätefosfat
- 2,5 g Natriumklorid
- 1 L MQ-vatten

M9-saltet autoklaverades separat.

LB-medium

- 5 g Trypton
- 5 g Natriumklorid
- 2,5 g Jästextrakt
- 10 g Agar
- 500 mL MQ-vatten

Vid förberedelse av flaskor till skakinkubator halverades mängderna ovan och agar exkluderades. Då medium till plattor förbereddes adderades även 10 g agar.

B Prover

Nedan följer kategorisering av de prov som togs. Mutan, alternan samt agar refererar till den polysackarid som fanns i plattan som provet odlades på. För "klar zon" menas att ett utrymme runt tillväxten börjat klarna till skillnad från den i övrigt vita plattan.

Skatås

Nr.	Namn på platta	Tillväxt-förhållande	Mutan (A)		Alternan (B)		Agar (C)
			Tillväxt	Klar zon	Tillväxt	Klar zon	Tillväxt
1	Orange svamp	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
2		Rumstemp.	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
3		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
4		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
5	Vattenprov, frusen damm	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
6		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
7		37 °C	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
8		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
9	Vit svamp	4 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Ja
10		Rumstemp.	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
11		37 °C	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
12		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
13	Jordprov, frusen damm, botten	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
14		Rumstemp.	Nej	Nej	Nej	Nej	Ja
15		37 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
16		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
17	Barrskog, växt i stilla vattendrag	4 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
18		Rumstemp.	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
19		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
20		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
21	Vattenprov damm	4 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
22		Rumstemp.	Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
23		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
24		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
25	Barrskog, förmultnat träd	4 °C	Nej	Nej	Ja	Ja	Nej
26		Rumstemp.	Ja	Nej	Ja	Ja	Ja
27		37 °C	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
28		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej

Nr.	Namn på platta	Tillväxt-förhållande	Mutan (A)		Alternan (B)		Agar (C)
			Tillväxt	Klar zon	Tillväxt	Klar zon	Tillväxt
29	Fallet träd	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
30		Rumstemp.	Ja	Ja	Nej	Nej	Ne
31		37 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
32		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
33	Lövskog, prov från björkstam	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
34		Rumstemp.	Ja	Nej	Nej	Nej	Nej
35		37 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Nej
36		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
37	Barrskog, stilla vattendrag	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
38		Rumstemp.	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
39		37 °C	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
40		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
41	Mossa på sten	4 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
42		Rumstemp.	Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
43		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
44		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
45	Gräsmark, jordprov	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
46		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
47		37 °C	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
48		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
49	Lövskog, jordprov	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
50		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Ja	Nej
51		37 °C	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
52		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
53	Rutten trädstam	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
54		Rumstemp.	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
55		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
56		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
57	Barrskog, jordprov	4 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
58		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
59		37 °C	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
60		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej

Änggårdsbergen

Nr.	Namn på platta	Tillväxt-förhållande	Mutan (A)		Alternan (B)		Agar (C)
			Tillväxt	Klar zon	Tillväxt	Klar zon	Tillväxt
61	Jordprov, fårhage	4 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
62		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
63		37 °C	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
64		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
65	Vit svamp	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
66		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
67		37 °C	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
68		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
69	Sågspån	4 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
70		Rumstemp.	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
71		37 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
72		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
73	Vattenprov, sjö	4 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Nej
74		Rumstemp.	Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
75		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
76		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
77	Avföring djur	4 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
78		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
79		37 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
80		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
81	Trädlav	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
82		Rumstemp.	Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
83		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
84		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
85	Barrskog, jordprov	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
86		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
87		37 °C	Ja	Nej	Nej	Nej	Nej
88		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej

Nr.	Namn på platta	Tillväxt-förhållande	Mutan (A)		Alternan (B)		Agar (C)
			Tillväxt	Klar zon	Tillväxt	Klar zon	Tillväxt
89	Svamp	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
90		Rumstemp.	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
91		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
92		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
93	Grön svamp	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
94		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
95		37 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
96		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
97	Mjuk svamp	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
98		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
99		37 °C	Nej	Nej	Ja	Nej	Ja
100		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
101	Avföring får	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
102		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Ja	Nej
103		37 °C	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
104		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
105	Sågspån	4 °C	Ja	Nej	Nej	Nej	Nej
106		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Nej
107		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
108		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
109	Mossa	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
110		Rumstemp.	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
111		37 °C	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
112		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej

Hästprov

Nr.	Namn på platta	Tillväxt-förhållande	Mutan (A)		Alternan (B)		Agar (C)
			Tillväxt	Klar zon	Tillväxt	Klar zon	Tillväxt
113	Hästsälv	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
114		Rumstemp.	Ja	Nej	Ja	Nej	Nej
115		37 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
116		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
117	Kraftfoder	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
118		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
119		37 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
120		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej
121	Avföring häst	4 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
122		Rumstemp.	Ja	Ja	Ja	Nej	Ja
123		37 °C	Ja	Nej	Ja	Nej	Ja
124		Anaerob	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej

C PCR-cykler

ITS-sekvensering

1. 98 °C under 1 minut.
2. 98 °C under 15 sekunder
3. 55 °C under 30 sekunder
4. 72 °C under 30 sekunder (1 kb/min).
5. 72 °C under 8 minuter.
6. 10 °C under resterande tid.

Steg 2-4 upprepades 45 gånger.

16S-sekvensering

1. 98 °C under 1 minut.
2. 98 °C under 30 sekunder
3. 60 °C under 30 sekunder
4. 72 °C under 50 sekunder (1 kb/min).
5. 72 °C under 8 minuter.
6. 10 °C under resterande tid.

Steg 2-4 upprepades 45 gånger.

D Bidragsrapport

I bilagan redovisas hur arbetet i gruppen fungerat samt individuella bidrag till rapport-skrivning och laborativt arbete. Under projektets gång har kommunikationen fungerat väl mellan både gruppmedlemmar samt handledare. Den största delen av kommuni-kationen har förts via tjänsten Slack; övrig kommunikation har förts vid möten med en majoritet av gruppmedlemmarna närvarande vid varje tillfälle. De medlemmar som inte kunde närvara vid ett specifikt möte kunde i efterhand ta del av mötesprotokollen vilka delades, tillsammans med allt annat digitalt material i projektet, via molntjänsten Google Drive.

Utifrån delarna i gruppkontraktet tilldelades alla gruppmedlemmar primära ansvarsom-råden. Emma utsågs till ansvarig för grupprumsbokning till möten och andra aktiviteter. Ifall Emma skulle få slut på timmar i sin kvot beslutades det att hon skulle höra av sig i Slack och någon annan ta på sig bokningsansvaret tillfälligt. Nästa ansvarsområde rörde laborationer där Sofia och Martina utsågs till ansvariga för laborationsrelaterad infor-mation. Ytterligare ett ansvarsområde var insändning av inlämningar, vilket Christina utsågs till huvudansvarig för. Det slutgiltiga ansvarsområdet var den grundläggande rapportstrukturen, med exempelvis en programmeringsmall i LateX. Ansvarsområdet tilldelades Enya och Sandra. Slutligen bestämdes det att alla i gruppen har ansvar för att hålla koll på deadlines och viktiga datum, eftersom detta ansågs vara en allför stor börda att lägga på en person. I samma gruppkontrakt redovisades även alla projektdel-tagares ambitionsnivåer. Alla deltagare bedömdes ligga på ungefär samma höga nivå, samt att förväntningarna när det gällde att skriva en bra rapport samt att vara del av ett utvecklande och roligt projekt var likvärdiga.

Under projektets gång har ansvarsområdena på pappret varit oförändrade, men snarare har alla hjälpts åt till bästa förmåga med alla projektets delar. Alla gruppmedlemmar är eniga om att alla medverkande personer har arbetat till sin yttersta förmåga med att göra ett så bra projekt som möjligt. Inga konflikter har heller uppstått vilket i sin tur gjort att inga förändringar av arbetsmetoden har bedömts vara nödvändiga. Med tanke på att alla medlemmar hjälpts åt med alla ingående delar i projektet finns det egentligen ingen anledning att tillägna en specifik person ett helt avsnitt i rappor-ten. Utöver rapportskrivning har alla deltagare även bidragit till det laborativa arbetet under projektets gång.