

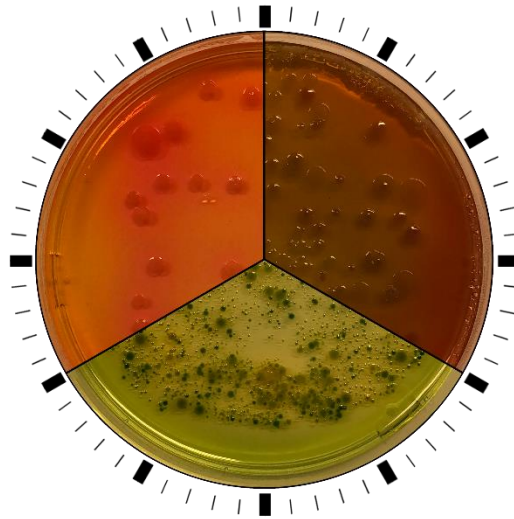


Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet NTNU
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

BACHELOROPPGAVE 2019

20 studiepoeng

Sammenligning av selektive dyrkingsmedier for påvisning av *Aeromonas*



Utført av

Henrik Arntsen Pedersen
Martin Brelum Mikalsen
Thorben Reiche

Dette arbeidet er gjennomført som ledd i bachelorutdanningen i matteknologi ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap, NTNU. Bruk av rapportens innhold skjer på eget ansvar.

Sammendrag

Metoden for påvisning av *Aeromonas* utarbeidet av Nordisk Metodikkomité for næringsmidler (NMKL) er ikke optimal. Dyrkningsmediet Stivelses Ampicillin Agar (SAA) som blir benyttet etter denne standarden har vist seg å være lite selektivt og tidskrevende å produsere. Uten flere verifiseringstester er det derfor vanskelig å påvise *Aeromonas* fra næringsmidler med en blandet mikroflora.

Hovedmålet med denne bacheloroppgaven var å sammenligne stivelse ampicillin agar (SAA) med to andre kommersielle selektive dyrkningsmedier. Disse var følgende: “Bile Salt Irgasan Brilliant Green agar” (BSIBG) og *Aeromonas* agar (Ryan).

Oppgavens første delmål var å dyrke opp *Aeromonas*- og sammenligne og dokumentere deres vekst på de tre selektive mediene.

For å undersøke medienes evne til å isolere *Aeromonas* fra en blandet mikroflora ble det tatt bakteriologiske analyser av laks, reker, røye, salat og spirer. Det ble både tatt analyser av den naturlig tilstedeværende mikrofloraen i næringsmidlene, i tillegg til lakseprøver som var kunstig kontaminert med en *Aeromonas*-kultur. Et utvalg av kolonier ble plukket for videre verifisering. Det ble utført polymerase chain reaction (PCR) av 16S rRNA for identifisering av presumtive og ikke-presumtive *Aeromonas*-isolater fra næringsmiddelprøvene. PCR-produktene ble sendt til sekvensering til et eksternt laboratorium.

Resultatene viste små forskjeller mellom SAA og BSIBG sin evne til å inhibere ikke-*Aeromonas* arter, Ryan ble vist til å ha noe dårligere selektivitet. Det kunne ikke identifiseres *Aeromonas* fra noen næringsmidler med unntak av de kunstig kontaminerte prøvene. Ved tilsetning av kulturen viste alle mediene evne til å gjenfinne *Aeromonas*, men det lyktes ikke å kvantifisere *Aeromonas* med tilsvarende konsentrasjon som ble tilsatt lakseprøven. *Pseudomonas* viste seg å være en dominerende slekt på flere av produktene og hadde et lignende koloniutseende som *Aeromonas* på både SAA og Ryan.

På grunn av BSIBG sin evne til å differensiere enkelte *Pseudomonas*-arter med et koloniutseende som skiller seg fra *Aeromonas*, og i tillegg til at mediet er svært enkelt å tillage, kan det være et bedre alternativ enn SAA.

Abstract

The method for the detection of *Aeromonas* prepared by the Nordic Committee on food analysis (NMKL) is not optimal. The culture medium Starch Ampicillin Agar (SAA) according to this standard has been shown to be poor in selectivity and time consuming to produce. Therefore, without several verification tests, it is difficult to detect *Aeromonas* in foods with a diverse microflora.

The main objective of this bachelor thesis was to compare starch ampicillin agar with two other commercial selective culture media. These were the following: "Bile Salt Irgasan Brilliant Green Agar" (BSIBG) and *Aeromonas* agar (Ryan).

The thesis first task was to cultivate *Aeromonas* species and compare and document their growth on three selective media.

To investigate the ability of the media to isolate *Aeromonas* from a diverse microflora, bacteriological analyzes of salmon, shrimp, char, lettuce and sprouts were taken. Analyzes of the naturally present microflora in the food were taken, as well as salmon samples that were artificially contaminated with an *Aeromonas* culture. A variety of colonies were picked for further verification. Polymerase Chain Reaction (PCR) of 16S rRNA was performed to identify presumptive and non-presumptive *Aeromonas* isolates from the food samples. The PCR products were sent for sequencing to an external laboratory.

The results showed a slight difference between SAA and BSIBG's ability to inhibit non-*Aeromonas* species, Ryan was shown to have somewhat poorer selectivity. *Aeromonas* could not be identified from any food except for the artificially contaminated samples. Upon addition of the culture, all the media showed the ability to identify *Aeromonas*, but it was not possible to quantify *Aeromonas* with a similar concentration that was added to the salmon samples. *Pseudomonas* proved to dominate the microflora in several of the products and had a similar colony appearance to *Aeromonas* on both SAA and Ryan.

Due to BSIBG's ability to differentiate certain *Pseudomonas* species with a colony appearance that differs from *Aeromonas*, and in addition to the medium being easy to prepare, it may be a better option than SAA.

Forord

Denne bacheloroppgaven i matteknologi er det endelige arbeidet i vår bachelorutdanning og teller 20 studiepoeng.

Vi hadde alle en interesse for å jobbe med en mikrobiologisk bacheloroppgave og denne har vist seg å være svært spennende og lærerik.

Det praktiske arbeidet har blitt utført ved NTNU, institutt for bioteknologi og matvitenskap ved deres mikrobiologiske laboratorium på Kalvskinnet. Laboratoriearbeidet ble utført fra uke 11 til 15 i 2019.

Vi vil utnevne vår takknemmelighet til hovedveileder Sunniva Hoel som har vært til stor hjelp gjennom hele oppgaven både ved det praktiske og det teoretiske arbeidet. Vi vil også takke instituttet for den finansielle støtten som har gjort denne oppgaven mulig.

Trondheim, 19 Mai 2019



Henrik Arntsen Pedersen



Martin Brelum Mikalsen



Thorben Reiche

Innholdsfortegnelse

1. Innledning	1
2. Teori	3
2.1 <i>Aeromonas</i> historie og taksonomi	3
2.2 Introduksjon til <i>Aeromonas</i> -slekten.....	4
2.2.1 Defensive virulensfaktorer, stress og overlevelse	7
2.2.2 Offensive virulensfaktorer, patogenitet.....	8
2.3 Risikoutsatte næringsmidler	9
2.3.1 Økologi	9
2.3.2 Vann og næringsmidler	9
2.3.3 Kvalitetsforringelse	10
2.3.4 Kvalitetskontroll	10
2.4 Dyrkingsmedier	11
2.4.1 Dyrkingsmedier for kvantifisering og kvalifisering av mikrobiologisk vekst.....	11
2.4.2 Generelle dyrkningskrav og tilsetninger til dyrkingsmedier	14
2.4.3 Agar	15
2.4.4 Selektive komponenter for <i>Aeromonas</i> -arter	16
2.4.5 Utvalgte selektive medier.....	19
2.5 Biokjemiske og molekylærbiologiske verifiseringstester	24
2.5.1 Polymerase chain reaction (PCR)	24
2.5.2 Nukleinsyre ekstraksjon, rensning og lagring	26
2.5.3 PCR-Amplifisering av 16S ribosomalt RNA	26
2.5.4 Hot-start PCR.....	27
2.5.5 Deteksjon og analysering av PCR produkt	27
2.5.6 Oksidasetesting	28
3. Materialer og metode	29
3.1 <i>Tillaging av dyrkingsmedier</i>	29
3.1.1 AEROMONAS agar (Ryan)	29
3.1.2 Bile Salts Irgan Brilliant Green agar (BSIBG)	30
3.1.3 Starch Ampicillin agar (SAA).....	30
3.1.4 Tryptic soy agar (TSA)	31
3.1.5 Plate Count Agar (PCA)	31
3.1.6 De man, Rogosa, Sharpe (MRSa)	31
3.1.7 Tryptone soya broth (TSB)	31
3.1.8 Peptonvann.....	31
3.2 <i>Oppdyrking av kjente bakteriestammer</i>	32
3.3 <i>Sammenligning av medienes evne til å isolere Aeromonas fra en blandet mikroflora</i>	34
3.4 <i>Kvantifisering av Aeromonas fra kunstig kontaminerte laksefileter</i>	35
3.5 <i>Identifisering av kolonier fra de selektive dyrkningsmediene</i>	37
3.5.1 Plukking av kolonier og rensing av DNA	37
3.5.2 Polymerase chain reaction (PCR) av 16S rRNA for identifisering av isolater fra næringsmiddelprøvene	38

3.5.3 Agarose gelelektroforese.....	39
3.5.4 Rensing, kvantifisering av PCR produkt.....	40
3.5.5 Identifisering av sekvenserte isolater	40
4. Resultater	41
4.1 <i>Oppdyrking av kjente bakteriestammer på de selektive mediene</i>	<i>41</i>
4.1.1 Betydningen av ampicillin-konsentrasjonen i Ryan agar.....	43
4.1.2 Bildedokumentasjon av typiske <i>Aeromonas</i> kolonier	44
4.1.3 Bildedokumentasjon av ikke- <i>Aeromonas</i> arter med lignende kolonier som <i>Aeromonas</i>	45
4.1.4 Bildedokumentasjon av enkelte ikke- <i>Aeromonas</i> arter med kolonier som skiller seg fra <i>Aeromonas</i>	46
4.2 <i>Sammenligning av medienes evne til å isolere Aeromonas fra en blandet mikroflora.....</i>	<i>47</i>
4.2.1 Identifisering og verifisering av plukkede kolonier	48
4.2.2 Resultater fra sekvensering	49
4.3 <i>Kvantifisering av Aeromonas i kunstig kontaminerte lakseprøver.....</i>	<i>53</i>
4.3.1 Konsentrasjon av inokulum	53
4.3.2 Gjennomsnittlig kimtall i referanseprøver av laks og kunstig kontaminerte lakseprøver med økende tilsatt bakteriekonsentrasjon	54
4.3.3 Identifisering og verifisering av plukkede kolonier	55
4.3.4 Resultater fra sekvenseringen	55
5. Vurdering	60
5.1 <i>Medietillagning</i>	<i>60</i>
5.2 <i>Oppdyrking av kjente bakteriestammer.....</i>	<i>62</i>
5.3 <i>Sammenligning av medienes evne til å isolere Aeromonas fra en blandet mikroflora.....</i>	<i>64</i>
5.4 <i>Kvantifisering av Aeromonas i kunstig kontaminerte lakseprøver.....</i>	<i>68</i>
5.5 <i>Molekylærbiologiske og biokjemiske verifiseringstester</i>	<i>71</i>
6. Konklusjon	73
7. Forslag til videre arbeid	74
8. Referanseliste	75

Vedlegg

Vedlegg 1: Bildedokumentasjon av typiske *Aeromonas*-arter på utvalgte selektive medier.

Vedlegg 2: Fullstendige resultater etter identifisering av plukkede kolonier

Vedlegg 3: Gelbilder etter elektroforese

Vedlegg 4: Konsentrasjoner av PCR-produkt

Vedlegg 5: Utrekninger av Inokulumkonsentrasjoner

1. Innledning

Bakgrunnen for denne oppgaven er at den eksisterende metodikken for påvisning av *Aeromonas* utarbeidet av Nordisk Metodikkkomité for næringsmidler (NMKL 150) ikke er optimal.

Hovedårsaken til dette er at det selektive dyrkingsmediet Stivelse Ampicillin Agar (SAA) som brukes for å identifisere *Aeromonas* har flere ulemper. Først og fremst inhiberes ikke bakgrunnsfloraen fullstendig siden mediet ikke er selektivt nok, og derfor medfører metodikken en gjennomførelse av flere tidskrevende verifiseringstester. Koloniutseende til forskjellige *Aeromonas*-arter differensierer lite i utseende, dermed kan det være vanskelig å skille ut bakgrunnsfloraen. Det er også en ulempe at mediet må lages fra bunnen fra, som både er tidskrevende og små måleavvik ved oppveining kan resultere i ikke reproduerbare analyseresultater. Dette gir grunnlag for å teste kommersielle medier som er enklere å tillage. I tillegg har SAA kort holdbarhet etter tillaging.

Sammenligning av ulike dyrkingsmedier kan derfor bidra til å forbedre metodikken, og Institutt for bioteknologi og matvitenskap kan ha nytte av denne utredelsen for en fremtidig revisjon av metodikken og for fremtidig prøvetaking knyttet til *Aeromonas*.

Per i dag finnes det ingen ISO-standard for påvisning av *Aeromonas* fra næringsmidler, men med økt fokus på betydningen av denne bakteriearten i næringsmidler er det behov for mer kunnskap og standardisering av metodikken.

Hovedmål

Hovedmålet med denne bacheloroppgaven var å sammenligne Stivelse Ampicillin Agar (SAA) fra NMKL 150 metoden med to andre kommersielle selektive dyrkingsmedier; “Bile Salt Irgasan Brilliant Green agar” (BSIBG) og *Aeromonas* agar (Ryan).

Sammenligningen av ulike selektive dyrkingsmedier for *Aeromonas* skjedde på grunnlag av ulike parametere. Hovedparameteren var selektivitet, det vil si hvorvidt mediene klarer å inhibere ikke-*Aeromonas* arter og dermed skille ut *Aeromonas* fra en blandet prøve med en mangfoldig mikroflora. Samtidig vil den visuelle differansen mellom ulike bakteriekolonier være av betydning. Andre parametere som definerer det best egnede mediet var brukervennlighet som tidsbruk og tillaging, samt anvendelse og holdbarhet.

For å oppnå hovedmålet gjennomgikk de tre dyrkingsmedier (SAA, BSIBG og Ryan) en rekke praktiske forsøk. Resultatene fra disse forsøkene skulle danne grunnlaget for vurderingen og sammenligningen av dyrkingsmediene. I kraft av dette ble hovedmålet brutt ned til flere teoretiske og praktiske delmål som skulle bidra til å oppnå oppgavens hovedmål.

De teoretiske delmålene skulle bidra til å danne et grunnlag av nødvendig kunnskap som trengs for å gjennomføre den praktiske delen av oppgaven og heretter til å vurdere resultatene fra det praktiske laboratoriearbeidet. Delmålene omhandlet både faktorer knyttet til bakterieslekten *Aeromonas*, men handlet hovedsakelig om dyrkingsmedier med fokus på næringskrav, selektivitet og differensiering.

De praktiske delmålene omhandlet hvordan laboratoriearbeidet skulle gjennomføres.

Laboratoriearbeidet hadde en sentral rolle i denne bacheloroppgaven og var av stor betydning for at hovedmålet skulle oppnås. De praktiske delmålene var følgende:

1. Beskrive og dokumentere vekst på de ulike dyrkingsmediene av et utvalg mesofile *Aeromonas*-arter, samt flere ikke-*Aeromonas* arter.
2. Sammenligne dyrkingsmedienes evne til å isolere *Aeromonas* fra et utvalg av næringsmidler med fokus på selektivitet og vekst av konkurrerende arter.
3. Gjennomføre molekylærbiologisk verifisering av kolonier som vokser på de ulike dyrkingsmediene. Dette innebærer isolering av DNA, gjennomførelse av polymerasekjedereaksjon (PCR) og gelektroforese, til slutt sendes prøver til sekvensering.
4. Vurdere dyrkingsmediene opp mot faktorer som selektivitet, differensieringsevne og brukervennlighet.

2. Teori

Teoridelen av oppgaven starter med en introduksjon om *Aeromonas* arten. Fokuset har vært hvilke utfordringer som foreligger rundt denne bakteriearten fra et matvitenskapelig perspektiv. Både det som angår mattryggheten, men også utfordringer rundt kvalitetsforringelse av næringsmidler. Formålet med dette var å belyse betydningen av *Aeromonas* for matindustrien, som dermed også belyser at det er et behov for en bedre, enklere og mer pålitelig metodikk for påvisning av denne bakteriearten.

Videre ble ulike risikoutsatte næringsmidler for *Aeromonas* identifisert og hvordan kvalitetskontroll av disse næringsmidlene gjennomføres. Deretter ble fokuset rettet mot dyrkningsmediene, som forøvrig er en del av kvalitetskontrollen og den mikrobiologiske prøvetakingsmetodikken. Hovedvekten av teoridelen ligger på utdypende kunnskap om dyrkningsmedier, og derav selektive medier og hvordan disse fungerer. Kunnskapen om de ulike dyrkningsmediene knyttes videre opp mot næringskravene til *Aeromonas*.

Teoridelen i oppgaven avsluttes med et kort kapittel om verifisering av bakteriearter gjennom biokjemiske og molekylærbiologiske metoder, oksidasetesting, polymer chain reaction (PCR) og DNA-sekvensering.

2.1 *Aeromonas* historie og taksonomi

I mange år har det vært store uenigheter om klassifiseringen til *Aeromonas*-arten. Det har både vært diskusjoner om hvordan *Aeromonas*-arten differensierer seg fra andre arter, men det har også vært uenigheter angående nomenklaturen og klassifiseringen til individuelle *Aeromonas*-stammer. De første beskrivelsene av organismer som kjennetegnes som *Aeromonas* i dag var på slutten av 1800 tallet og begynnelsen av 1900. På den tiden var metodene for bakterieidentifisering primitive, av den grunn er det usikkert om de identifiserte bakteriene faktisk var *Aeromonas*-arter. (Farmer, Arduino, & F.W, 2006, s. 564-576)

I begynnelsen ble *Aeromonas*-arter både klassifisert som *Bacillus*, *Bacterium* eller *Aerobacter*. På 20´ og 30´ tallet ble forskerne enda mer uenige om hvordan denne bakteriegruppen skulle klassifiseres. I disse årene ble *Aeromonas* omtalt i litteraturen som *Proteus*, *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Flavobacterium*, *Bacterium*, *Necromonas*, *Vibrio*, og *Aeromonas*. Navnet *Aeromonas* ble første gang nevnt i 1936 av Kluyver og van Niel. (Farmer et al., 2006, s. 564-567)

Først på 1960 tallet ble forskerne i større grad enige om definisjonen av *Aeromonas* arten. I 1974 ble det publisert en beskrivelse av *Aeromonas* i en kjent bok (*Bergeys Manual*) som omhandler klassifisering for bakterier, det ble anmerket at *Aeromonas* arten består av tre slekter: *A. hydrophila*, *A. punctata*, og *A. salmonicida*. (Farmer et al., 2006, s. 564-567)

I de siste tiårene har metodene for identifisering av bakterier blitt betydelig bedre. Det har blitt brukt både DNA-DNA hybridisering, samt sekvensering av husholdningsgenet 16S rRNA for å identifisere og klassifisere *Aeromonas*. Per i dag er den mest presise metoden sekvensering av genene «*rpoD*» og «*gyrB*», som har gjort det mulig å bygge et meget presist fylogenetisk tre for *Aeromonas*. (Hoel, Vadstein, & Jakobsen, 2019)

2.2 Introduksjon til *Aeromonas*-slekten

Aeromonas er en gram-negativ, stavformet, ikke sporedannende og fakultativt anaerob bakterie (Percival & Williams, 2013a, s. 49). De er også oksidase og katalase positive og kan redusere nitrat til nitritt og fermentere D-glukose med eller uten produksjon av gass (Janet, Gordon, & Rosamund, 2012, s. 445-455). *Aeromonas*-arter deles inn i to grupper, de ikke bevegelige psykrotrofe og de bevegelig mesofile. De psykrotrofe er hovedsakelig fiskepatogene artene som for eksempel *Aeromonas salmonicida* som har optimum temperaturer mellom 22 til 28 °C, der de mesofile har 35 til 37 °C. (Percival & Williams, 2013a, s. 49) Figur 1 viser klassifiseringen av *Aeromonas*-slekten.

Slekt:	Aeromonas
Familie:	Aeromonadaceae
Orden:	Aeromonadales
Klasse:	Gammaproteobacteria
Phylum:	Proteobacteria
Domene:	Bacteria

Figur 1: Klassifisering av Aeromonas (Wikipedia, u.å.)

Mesofile *Aeromonas* inneholder arter som er humanpatogene, *A. hydrophila* har blitt klassifisert som en truende matbåren humanpatogen der både vann og mat har blitt identifisert som mulige kilder til kontaminasjon (Jahid, Mizan, Myoung, & Ha, 2019). Dette fører til at *Aeromonas* er en relevant bakterie for både næringsmiddel- og drikkevannsindustrien (Percival & Williams, 2013a, s. 49). *Aeromonas*-infeksjoner har blitt mest observert på sommeren og tidlig høst der barn er de mest risikoutsatte og kommer som regel av at en person har blitt utsatt for ubehandlet vann, selv om konsum av ulike matvarer som kjøtt og meieriprodukter også har vært kontaminasjonskilder (Lamps, 2010, s. 9). Tabell 1 viser artsoversikt for *Aeromonas*-slekten.

Tabell 1: Artsoversikt for *Aeromonas*. Tabellen viser alle de 36 ulike artene innad *Aeromonas*-slekten og hvor artene er funnet. (Oversatt fra Hoel et al., 2019)

Art	Reservoar
<i>A. allosaccharophila</i>	Ål
<i>A. aquatica</i>	Ferskvann
<i>A. aquatilis</i>	Ferskvann
<i>A. australiensis</i>	Ferskvann
<i>A. bestiarum</i>	Fisk
<i>A. bivalvium</i>	Bløtdyr
<i>A. cavernicola</i>	Ferskvann
<i>A. caviae</i>	Marsvin
<i>A. crassostreae</i>	Østers
<i>A. dhakensis</i>	Akvariumvann
<i>A. diversa</i>	Menneske
<i>A. encheleia</i>	Ål
<i>A. enterica</i>	Menneske
<i>A. eurenophila</i>	Ferskvannsfisk
<i>A. finlandiensis</i>	Ferskvann
<i>A. fluvialis</i>	Ferskvann
<i>A. hydrophila</i>	Melk
<i>A. intestinalis</i>	Menneske
<i>A. jandaei</i>	Menneske
<i>A. lacus</i>	Ferskvann
<i>A. lusitana</i>	Vann
<i>A. media</i>	Vann
<i>A. molluscorum</i>	Bløtdyr
<i>A. piscicola</i>	Fisk
<i>A. popoffii</i>	Drikkevann
<i>A. rivipollensis</i>	Elvesedimenter
<i>A. rivuli</i>	Ferskvann
<i>A. salmonicida</i>	Fisk
<i>A. sanarellii</i>	Menneske
<i>A. schubertii</i>	Menneske
<i>A. simiae</i>	Apefeces
<i>A. sobria</i>	Fisk
<i>A. taiwanensis</i>	Menneske
<i>A. tecta</i>	Menneske
<i>A. trota</i>	Menneske
<i>A. veronii</i>	Menneske

2.2.1 Defensive virulensfaktorer, stress og overlevelses

A. hydrophila har evnen til å gå inn i en fase der cellene er levende men ikke dyrkbare. Fasen omtales som VBNC-state (viable but non-culturable) og har som formål å beskytte bakterien mot ytre stress som forårsakes av eksempelvis lav pH, lav temperatur og/eller osmotisk sjokk.

Bakterier som er i VBNC fasen kan omvandles tilbake når vekstvilkårene i miljøet blir bedre. (Awan et al., 2018)

Aeromonas har et mangfoldig regulatorisk system som har flere ulike overlevelsesmekanismer. De regulatoriske mekanismene bidrar til å beskytte eller tilpasse organismen til forskjellige miljø- og stressfaktorer som varme, kulde, lav næringstilgang, pH-variasjoner osv. (Awan et al., 2018)

To-komponent regulatoriske systemer (TKR-system) har som formål å opprette en forbindelse mellom ytre signaler, som miljøendringer, og cellens indre mekanismer (tabell 2). Systemet består av to komponenter, vanligvis et transmembranprotein som fungerer som en sensor og et reguleringsprotein som regulerer prosessen. Disse systemene er av fundamental betydning for samspillet mellom bakteriene og det ekstracellulære miljøet.

På grunn av *A. hydrophila* sine omfattende regulatoriske mekanismer for å tilpasse og beskytte seg mot miljøet, utgjør denne en reell trussel mot mattrykgheten. (Awan et al., 2018)

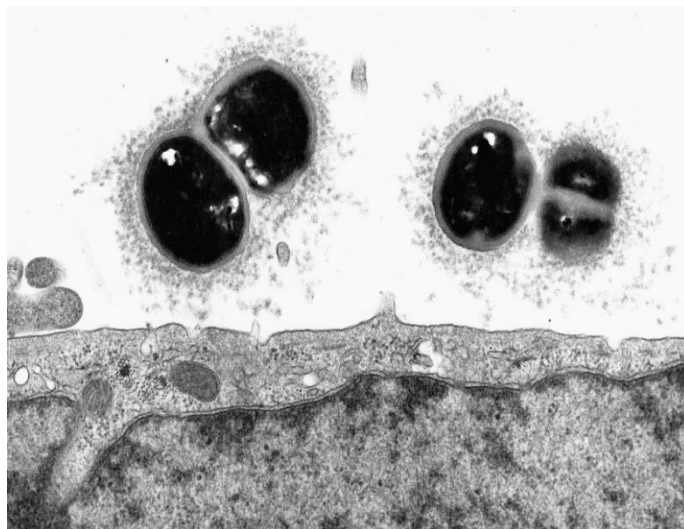
Tabell 2: Oversikt over TKR-systemene som finnes hos *A. hydrophila* (Awan et al., 2018)

Sr#	Name	Function
1	PhoR-PhoB	PO_4^{-3} starvation
2	PhoQ-PhoP	Mg^{+2} transport
3	EnvZ-OmpR	Osmotic stress
4	RstB-RstA	Stress
5	CpxA-CpxR	Envelope stress
6	CreC-CreB	PO_4^{-3} regulation
7	QseC-QseB	Quorum sensing
8	KdpD-KdpE	K^+ transport
9	ArcB-ArcA	Anoxic redox control
10	NarQ-NarP	NO_2 respiration
11	UhpB-UhpA	Hexose phosphates uptake
12	BarA-UvrY	Central-carbon metabolism
13	EvgS-EvgA	Acid and drug tolerance
14	GlnL-GlnG	N_2 regulation
15	GlrK-GlrR	Amino sugar metabolism
16	PgtB-PgtA	Phosphoglycerate transport
17	TtrS-TtrR	Tetrathionate respiration
18	FlrB-FlrC	Polar flagellar synthesis
19	AdeS-AdeR	Antimicrobial resistance
20	TorS-TorR	TMAO respiration

2.2.2 Offensive virulensfaktorer, patogenitet

I tillegg til å forårsake død i fisk samt sykdom i fugler, amfibier, reptiler og pattedyr er *Aeromonas* en årsak til ekstraintestinale sykdommer i mennesker, dette inkluderer gastroenteritter (akutt diaré), bakteriemi og sårinfeksjoner (D. Liu, 2014, s. 1099). Selv om *Aeromonas* har blitt linket med produksjon av gastroenteritter er det fortsatt debatter om artens patogenitet og epidemiologi. Men med informasjonen vi har i dag er det kan vi si at flere *Aeromonas*-arter og spesielt *A. hydrophila* burde erkjennes som en humanpatogen med produksjon av gastroenteritt og forårsaker diaré for en betydelig andel av populasjonen. (Percival & Williams, 2013a, s. 49)

Aeromonas-arter er stavformet og har en størrelse mellom 0.3-1.0 x 1.0-3.5 µm. Vanlig forekomst er alene eller i par, men det finnes også kjedeformende varianter (Awan et al., 2018). *Aeromonas* har flere fysiske egenskaper (biofilm, flageller, pili, kapsel, lipopolysakkarider, glukon, S-lag og ytre membran proteiner) for å beskytte seg mot fiendtlige miljøer og hjelpe deres bevegelighet, samt adheranse (figur 2). Aeromonader har også et bredt antall ulike toksiner, enzymer og andre produkter den kan produsere for å legge til rette deres invasjon av vertsceller og unngå seg fra vertens immunsystem. (D. Liu, 2014, s. 1104)



Figur 2: viser *Aeromonas caviae* som fester seg til en celle vha. dens adheranseegenskaper. Bildet er tatt med elektronmikroskop. (Parker & Shaw, 2011)

2.3 Risikoutsatte næringsmidler

Selve tilstedeværelsen av *Aeromonas* i miljøet er av grunnleggende betydning for at den kan havne i næringsmidler, føre til kvalitetsforringelse av disse, eller i verste fall forårsake sykdom hos mennesker. En av utfordringene er at denne bakteriearten finnes overalt i naturen, *Aeromonas* finnes i jord, ferskvann, saltvann, pattedyr, insekter osv. I praksis betyr dette at det foreligger svært mange muligheter for at det kan skje interaksjoner mellom mennesket og bakteriene. (J Michael Janda & Abbott, 2010) Dette kapitlet innledes med en kort del om hvordan ulike miljøfaktorer påvirker tilstedeværelsen av *Aeromonas* i økosystemet, videre skal risikoutsatte næringsmidler identifiseres. I slutten av kapitlet blir det beskrevet hvordan næringsmidler kan kvalitetskontrolleres gjennom mikrobiologiske analyser og bruk av dyrkningsmedier.

2.3.1 Økologi

Selv om *Aeromonas* som slekt finnes overalt i miljøet, finnes det likevel mønstre på hvor enkelte *Aeromonas*-arter finnes. Bakteriearten er faktisk mest kjent for å være en del av akvatiske økosystemer. Eksempelvis finnes *Aeromonas salmonicida* hovedsakelig i sjøvann og i ulike fiskearter. En av årsakene for at *Aeromonas* viser stor forekomst i saltvann er nettopp bakterienes toleranse for en nokså høy saltkonsentrasjon, i tillegg til at de trives ved både lave og høye temperaturer. (J Michael Janda & Abbott, 2010)

Interaksjonen mellom *Aeromonas* og miljøet påvirkes av flere ulike miljømessige forhold som blant annet temperatur, pH-nivå og næringstilgang. Som tidligere nevnt har *Aeromonas*-bakterien et omfattende TKR-system som fanger opp ulike signaler fra miljøet og som fører til intracellulære reguleringer for at bakterien tilpasses til miljøet. (Awan et al., 2018)

2.3.2 Vann og næringsmidler

Aeromonas bakterier kan bli funnet i mange ulike vannreservoarer som innsjøer, elver, sjøvann, grunnvann og i kloakken. Når det gjelder sjøvann, lever bakteriene ofte i lag med ulike krepsdyr og fiskearter, men de finnes også ofte frittlevende der en elvemunning møter havet. (J Michael Janda & Abbott, 2010) *Aeromonas* kan smitte mennesker via konsum av næringsmidler og forårsake sykdom. Bakteriene har tidligere blitt påvist i en rekke ulike matprodukter. En studie

fra 2011 analyserte ulike næringsmidler, og fant *Aeromonas* både i kylling, fisk og spirer (Nagar, Shashidhar, & Bandekar, 2011). *Aeromonas*-bakterier har også vist stor forekomst i spiseklare sushiretter, Hoel, Mehli, Bruheim, Vadstein, and Jakobsen (2015) fant *Aeromonas* i 71 % av sushirettene som ble analysert.

2.3.3 Kvalitetsforringelse

Mikrobiologisk vekst i rå og prosesserte matvarer er viktig i henhold til forringelse og ødeleggelse av næringsmidler. Mikroorganismer bruker næring fra produktene til å produsere energi, cellulære komponenter og flere ulike sluttprodukter. (Erkmen & Bozoglu, 2016, s. 31)

Foringelse er definert som sensoriske endringer av en matvare som gjør produktet uakseptabel som føde. Mikrobiologisk forringelse er den mest vanlige grunnen for slike endringer og kan vises på produktet i form av vekst (slimdannelse og kolonier), som teksturendringer eller som ikke ønskelige dufter og smaker. (Gram et al., 2002)

Aeromonas-arter er anerkjente kvalitetsforringelsesbakterier i spesielt sjømatprodukter. En av de mest akutte artene er *A. salmonicida* som hovedsakelig er en del av mikrobiotaen i fisk, men har også blitt funnet i ulike krepsdyr. (Hoel et al., 2019)

2.3.4 Kvalitetskontroll

Det stilles krav til mikrobiologisk kvalitetskontroll når dette er hensiktsmessig i matindustrien, som bakteriologiske analyser av næringsmidler (Næringsmiddelhygieneforskriften, 2008, kapittel 2). Hovedgrunnen til dette er først og fremst å sikre mattryggheten gjennom kontroll av eventuelle patogene mikroorganismer i produktene. Mens det sekundære formålet er å holde kontroll med den kvalitetsforringende mikrofloraen i næringsmidler. Det finnes ulike metoder som kan benyttes for å gjennomføre slike kontroller. En av de vanligste metodene baserer seg på vekst av mikroorganismer og kolonitellinger, slike metoder kalles kintallmålinger. (Frøyen, 2018, s. 52-55)

Klassiske kintallmålinger gjennomføres med platespredningsmetoder som innebærer at en fortynt næringsmiddelprøve strykes ut på et fast dyrkningsmedium og inkuberes ved bestemte betingelser for å gi en indikasjon på næringsmidlenes mikrobiologiske tilstand og kvalitet. (Jakobsen, 2018)

NMKL 150 metoden er et eksempel på kvalitetskontroll som gjennomføres for å holde kontroll på mikrofloraen i næringsmidler. Nærmere sagt en spesifikk del av mikrofloraen, nemlig *Aeromonas*. I denne metoden utføres nettopp en platespredningsmetode der det benyttes et selektivt dyrkningsmedium for en kvantitativ bestemmelse av presumtive *Aeromonas*. (Nordic-Committee-on-Food-Analysis, 2004)

Ulike faktorer knyttet til dyrkningsmediens virkningsmekanisme, oppbygning og selektivitet omtales i neste delkapittel.

2.4 Dyrkningsmedier

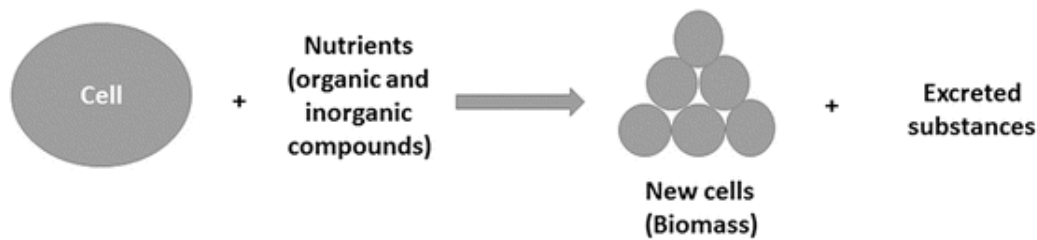
For å identifisere tilstedeværende mikroorganismer i næringsmidler eller andre biologiske systemer kan det gjennomføres mikrobiologiske analyser.

Det finnes mange ulike framgangsmåter for slike analyser, en av disse innebærer bruken av dyrkningsmedier for å kvalitativ og kvantitativ påvisning av mikroorganismer. For å forstå hvordan virkningsmekanismene for slike dyrkningsmedier fungerer, trengs det utdypende kunnskap og forståelse.

2.4.1 Dyrkningsmedier for kvantifisering og kvalifisering av mikrobiologisk vekst.

For å kultivere mikroorganismer på laboratoriet er det essensielt at mikroorganismene er forsynt med alle nødvendige næringsstoffer. Næringsbehov varierer i stor grad og derfor er kunnskapen om de nødvendige mikrobiologiske og ernæringsmessige kravene viktig for en vellykket oppdyrking av mikroorganismer. (Madigan, 2015, s.74)

Alle mikroorganismer tar opp oppløste forbindelser fra miljøet, som brukes for å utvinne energi og for å vedlikeholde og skape ny biomasse. Under den metabolske aktiviteten, blir avfall og giftige substanser utskilt i omgivelsene som illustrert i figur 3. (Mohanta, Dutta, & Goel, 2017, s. 306)



Figur 3: Skjematisk oversikt over metabolismen i en mikroorganisme.

(Mohanta et al., 2017, s. 306)

2.4.1.1 Kjemiske sammensetning til en celle

De nødvendige næringskomponentene som mikroorganismene trenger, danner grunnlaget for at det helhetlige metabolske maskineriet skal gå rundt. (Madigan, 2015, s. 74; NPTEL, 2014)

Organismer har ulike næringsbehov og trenger derfor ulike mengder av næringsstoffer. Ikke alle næringsstoffer kreves i like store mengder og de blir derfor oppdelt i makrostoffer som kreves i store mengder og mikroster som kreves i små mengder (<1 % tørrmasse). (Madigan, 2015, s. 74)

Av totalt 96 grunnstoffer som finnes i naturen blir kun 26 av de brukt av levende organismer.

Bakterielle celler antas å være mellom 70 – 90 % vann, mens 95 % av cellenes tørrmasse består kun av noen få hovedkomponenter: hydrogen (H), oksygen (O), karbon (C), nitrogen (N), fosfor (P), svovel (S) og selen (Se). (Goel, 2017, s. 276; Madigan, 2015, s. 74)

2.4.1.2 Makronæringstoffer

Makronæringstoffer er definert som næringsstoffer som utgjør >1% av cellens tørrvekt. Alle celler krever karbon, og de fleste av prokaryoter (heterotrofe organismer) krever organiske karbonholdige forbindelser som karbonkilde. Tabell 3 viser den kjemiske sammensetningen til en generell celle. Omtrent 50 % av tørrvekten til en bakteriecelle består av karbon. Karbon er et av de viktigste komponentene i en organisme, siden alle celler har et stort behov for karbon for å kunne danne nytt cellemateriale. Hvilken karbonkilde som kan brukes er avhengig av hvilken organisme som skal dyrkes. Karbonkilder er aminosyrer, fettsyrer, organiske syrer, sukker, nitrogenbaser og en rekke andre stoffer. En bakteriecelle består i tillegg av ca. 14 % nitrogen, i form av proteiner, nukleinsyrer og andre cellebestanddeler. Hoveddelen av nitrogen som er

tilgjengelig i naturen finnes i form av ammoniakk (NH₃), nitrat (NO₃⁻) eller nitrogen gass (N₂). Nesten alle prokaryoter kan bruke NH₃ som nitrogenkilde, men mange kan også bruke NO₃⁻ og noen kan bruke organiske nitrogenkilder eksempelvis aminosyrer. (Madigan, 2015, s. 75-76)

Tabell 3: Generell kjemisk sammensetning til en mikroorganisme oppgitt i %. (Mohanta et al., 2017, s. 307)

Grunnstoff	Kjemisk forkortelse	%	
Karbon	C	50	Makronæringstoffer
Oksygen	O	20	
Nitrogen	N	14	
Hydrogen	H	8	
Fosfor	P	3	
Svovel	S	1	
Kalium	K	1	
Natrium	Na	1	
Kalsium	Ca	0,5	Mikronæringstoffer
Magnesium	Mg	0,5	
Klor	Cl	0,5	
Jern	Fe	0,2	
Resterende	-	0,3	

2.4.1.3 Mikronæringstoffer

Mikronæringstoffer er definert som næringsstoffer som utgjør <1 % av cellens tørrvekt. Dette inkluderer stoffer som kalsium (Ca), magnesium (Mg), jern (Fe), mangan (Mn), sink (Zn), kobolt (Co), molybden (Mo), nikkel (Ni) og kobber (Cu) som er et behov for de fleste celler.

Magnesium (Mg) fungerer som en kofaktor til mange enzymer og stabiliserer ribosomer og cellemembraner. Jern (Fe) er en del av cytokromer og en kofaktor for enzymer og elektronbærende proteiner. Kalsium (Ca) bidrar til varmeresistensen til av bakterielle endosporer,

15 % av sporer inneholder dipikolinsyre og kalsium. (Mohanta et al., 2017, s. 307; NPTEL, 2014)

Andre mikronæringsstoffer som sink (Zn) brukes av det aktive setet til noen enzymer, og befinner seg i aminosyrer som selenocystein. Mangan (Mn) hjelper enzymer å katalysere og overføre fosfatgrupper mens Molybden (Mn) kreves for nitrogenfiksering. (NPTEL, 2014)

2.4.2 Generelle dyrkningskrav og tilsetninger til dyrkingsmedier

Et dyrkingsmedium er en sammensetning av ulike næringskomponenter som blir brukt til å kultivere mikroorganismer. Det finnes i hovedsak to typer dyrkingsmedier: definerte medier og komplekse medier. (Madigan, 2015, s. 76)

Et definert / kjemisk definert medium framstilles ved å tilsette nøyaktig mengde rene uorganiske eller organiske kjemikalier og destillert vann, som vil si man vet den eksakte sammensetningen til de kjemiske komponentene i detalj. Innholdet i mediet er derfor definert og kjent. Et kjemisk definert medium kan eksempelvis brukes for å undersøke effekten av ulike kjemiske forbindelser på veksten til mikroorganismer. I nesten alle andre tilfeller benytter man komplekse medier som er tilpasset de ulike mikroorganismene og er enklere å lage, bruke og gir gode vekstvilkår. (Tronsmo, 2016, s. 10)

Et komplekst medium er et medium hvor man ikke kjenner til alle de kjemiske komponentene på et detaljert nivå, istedenfor å tilsette en rekke definerte kjemikalier kan man tilsette komplekse ingredienser som inneholder en rekke vitaminer og andre vekstfaktorer. (Tronsmo, 2016, s. 10)

Eksempelvis kan man tilsette kjøttekstrakt som er framstilt ved inndamping av vann i kjøtt for så å presse kjøttet for å danne en «kjøttsaft» ut av kjøttet, vanligvis er det storfekjøtt som blir brukt. Kjøttekstrakt inneholder nitrogen, aminosyrer, vitaminer og karbon. Kjøttekstrakt utgjør vanligvis rundt 0,3 % og overstiger sjeldent 0,5 % av den totale sammensetningen av mediumet. (Acumedia, 2017a, s. 1)

Gjærekstrakt har tilnærmet samme funksjon som kjøttekstrakt. Gjærekstrakt er et autolysat fra gjærceller. Som regel anvendes det en konsentrasjon mellom 0,3 til 0,5 % av den totale sammensetningen til mediumet.. Gjærekstrakt tilfører medier vitaminer, nitrogen, aminosyrer og karbon og er en utmerket stimulator for bakteriell vekst. (Acumedia, 2017b, s. 1)

Medier kan også kategoriseres etter ulike vilkår som danner grunnlaget for mikrobiell vekst. I slike medier reguleres ulike parametere for å enten inhibere enkelte organismer eller for å differensiere mellom dem. Eksempelvis ved tilsetning av ampicillin (antibiotikum) vil man hemme gram-positive bakterier samt de fleste gram-negative bakterier og derav er mediumet definert som et selektivt medium grunnet vekstmuligheter til bare for noen spesifikke mikroorganismer. Differensielle medier undertrykker ikke andre mikroorganismer, men gjør det enklere å differensiere mellom ulike mikroorganismer, eksempelvis at spesifikke bakterier får farge. Anrikningsmedium brukes for å gi vekstvilkår til spesielle grupper mikroorganismer, eksempelvis mikroorganismer som kan leve på fenol som den eneste karbonkilde. (Tronsmo, 2016, s. 10)

2.4.3 Agar

Agar er en essensiell bestanddel i et dyrkingsmedium. Agar er en polymer som består av underenheter av sukkeret galaktose og befinner seg mest i celleveggen til flere arter av røde alger. Agar fungerer som en konsistensgiver til medium og skiller seg fra vanlig gelatin ved at agar blir ikke degradert (spist) av bakterier, i tillegg er agar også fastere og danner sterkere gel enn gelatin. (S. Liu, 2019)

Agar danner gel ved romtemperatur, og holder seg fast opp til 65°C. Agar smelter ved ca. 85°C som er ulikt gelerings temperaturen til agar mellom (32-40) °C. Egenskapen å ha ulikt smeltepunkt og geleringspunkt er kalt termisk hysteresis som gir mediumet en god balanse mellom smelting og god stabilitet ved relativt høye temperaturer ved inkubering. Agar er generelt resistent mot skjærspenning, forskjellige agare kan ha ulik gelstyrke og grad av stivhet. (S. Liu, 2019)

Agar brukes som regel i en sluttkonsentrasjon på 1-2 % for konsistensgivning av kulturmedier. Spesifikasjoner for agar av bakteriologisk kvalitet inkluderer god klarhet, kontrollert gelerings temperatur, kontrollert smelte temperatur, gode diffusjonsegenskaper, fravær av bakterielle inhibitorer og relativt fravær av metabolsk nyttige mineraler og forbindelser. (S. Liu, 2019)

2.4.4 Selektive komponenter for *Aeromonas*-arter

De fleste ingredienser som blir brukt til isolering av *Aeromonas* er likt det som brukes til isolering av Enterobacteriaceae og *Vibrio*-arter. Dette inkluderer komponenter som gallesalter, farger, antiseptiske stoffer, antibiotika og vibrostatikum.

2.4.4.1 Vibriostatikum

Arter fra slekten *Vibrio* og *Aeromonas* kan vokse på samme agar og kan forstyrre deteksjonen av *Aeromonas*. For å forhindre vekst av *Vibrio*-arter kan man tilsette «2,4 diamino-6,7-diisopropyl-pteridine phosphate» også kjent som vibriostatikum eller O/129. *Vibrio*-arter er sensitive for O/129 og vil derav ikke gro på mediumet mens *Aeromonas* vil være resistent. I de fleste medier har det blitt avendt en konsentrasjon på 50 mg/L for hemming av vekst av *Vibrio*-slekten. (Martin-Carnahan, Joseph, & Garrity, 2005, s. 557; Prevention, 2019, s. 14)

2.4.4.1 ampicillin

Ampicillin er det mest brukte antibiotikumet i *Aeromonas*-medier, på grunn av *Aeromonas* sin brede resistens mot ampicillin. De fleste arter av *Aeromonas* har blitt påvist å være resistent. Alle arter bortsett fra *A. trota* er resistent mot. Ampicillin hindrer veksten av gram-positive og de fleste gram-negative bakterier (Corry Janet, Curtis Gordon, & Baird Rosamund, 2012, s. 458-459; Sachan & Agarwal, 2000, s. 71). Ampicillin er også effektivt for å hemme koliforme bakterier og andre bakterier fra Enterobacteriaceae-familien, men hemmer ikke *Pseudomonas fluorescens*. (Palumbo, Maxino, Williams, Buchanan, & Thayer, 1985, s. 1028)

Noen studier viser at tilsetning av 32 mg/L ampicillin inhiberer kun 17 % av *Aeromonas*-arter isolert fra ulike miljøprøver (Huddleston, Zak, & Jeter, 2007, s. 1). Ofte er det brukt konsentrasjoner mellom 10-30 mg/L. Det har også blitt utført forsøk av medier med 100 mg/L ampicillin, men dette viste dårlige resultater grunnet høy dosering av ampicillin (Corry Janet et al., 2012, s. 458-459).

2.4.4.2 Gallesalter

Gallesalter også kjent som natriumdeoksykolasat blir tilsatt i noen medier, inkludert Bile Salt Irgasan Brilliant green (BSIBG) agar for inhibering av gram-positive bakterier og ved høye konsentrasjoner kan de hemme noen gram-negative bakterier. Konsentrasjonen av gallesalter varierer mellom 1-8,5 g/L (Corry Janet et al., 2012, s. 460). Det finnes en rekke ulike gallesalter

med ulik inhibering av bakterier. Gallesalter kan også brukes til inhibering av *E. coli*. Testing av 7 ulike galesalter på 37 ulike *Aeromonas*-stammer viser at alle *Aeromonas* artene ble lik eller mindre inhibert enn *E. coli*. For inhibering av *Aeromonas*-arter er det nødvendig å tilsette mellom 5 til 10 ganger så mye som normalt. (Want & Millership, 1990, s. 50-52)

2.4.4.3 Irgasan

Irgasan også kjent som Triclosan (5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol C₁₂H₇Cl₃O₂) er et bredspektret antimikrobielt virkemiddel og inhibitor av enoyl-ACP (acrylic carrier protein) av type II fettsyresyntase i bakterier. I dyrkningsmedier vil triklosan virke hovedsakelig mot gram-positive bakterier, men har også evne til å virke mot gram-negative bakterier, mugg og virus. (Mycrobe, 2019)

Irgasan blir blant annet brukt i Bile Salts Irgasan Brilliant Green (BSIBG) og Cefsulodin Irgasan Novobiocin (CIN) agar for å inhibere veksten av noen gram-negative bakterier som forstyrer isoleringen av *Aeromonas* ved en konsentrasjon mellom 4-5 mg/L. (Corry Janet et al., 2012, s. 459-460)

2.4.4.4 Karbohydrater

For å differensiere *Aeromonas* fra bakgrunnsfloraen har det blitt brukt en rekke ulike karbohydrater. De fleste arter innad *Aeromonas* er laktose-negative, men noen få stammer har evne til å utvikle laktosefermentering. Av denne grunnen er de fleste selektive mediene utviklet for isolering av *Aeromonas* basert på andre karbohydrater. (Corry Janet et al., 2012, s. 460)

Noen medier bruker fermenterbare karbohydrater og en pH-indikator for å detektere syreproduksjon. De mest vanlige fermenterbare karbohydratene er dextrin, mannitol, glykogen og maltose. Andre medier bruker karbohydrater *Aeromonas* ikke fermenterer for å differensiere mellom *Aeromonas* og Enterobacteriaceae, de mest brukte er xylose og myo-inositol. Stivelse er vanligvis tilsatt i konsentrasjon mellom 10-20 g/L i noen differensielle medier siden *Aeromonas* er amylase-positiv. En pH-indikator bekrefter syreproduksjon og Amylaseaktiviteten blir påvist ved å tildekke petriskålen med lugols-joddoppløsning som resulterer i et svart medium bortsett fra amylase-positive kolonier som blir omringet av en klar sone. (Corry Janet et al., 2012, s. 460-461)

2.4.4.5 Fargestoffer

Brilliant green

Brilliant green er blitt brukt i mange Enterobacteriaceae-medier. Ved identifisering av *Aeromonas* blir det brukt en konsentrasjon mellom 0,5-5 mg/L. En konsentrasjon på 0,5 mg/L viser seg å være optimalt fordi en konsentrasjon på 1,0 mg/L ga et lavere kolonitall (Corry Janet et al., 2012). Brilliant green inhiberer gram-positive bakterier og de fleste gram-negative bakterier. (Bakker, Van Doorne, Gooskens, & Wieringa, 1992)

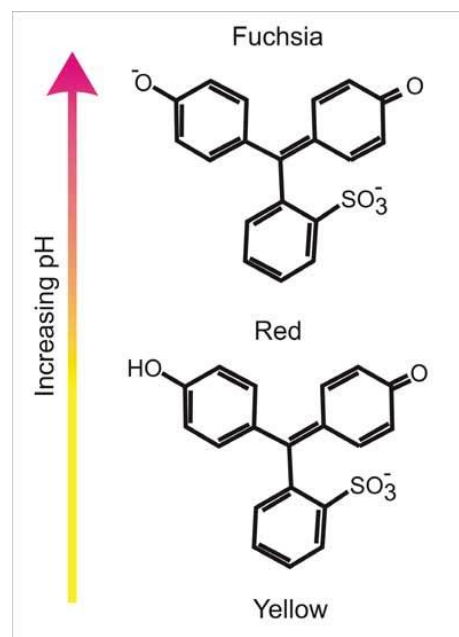
Fenolrød

Fenolrød er en pH indikator som med en pH økning fra 6,2 til 8,2, gradvis endrer farge fra gul til rød. Ved pH verdier over 8,2 vil farge bli en kraftig rosa. (Held, 2018)

Ved veldig lave pH-verdier vil den være fargeløs og eksistere som et zwitterion (Bestående av både en positivt ladet ketongruppe og en negativt ladet sulfat gruppe). Med økende pH ($pK_a=1,2$) vil det ekstra protonet i ketongruppen forsvinne som videre resulterer i en gul farge. Når pH øker ytterlig ($pK_a=7,7$) fører det til at hydroksylgruppen mister hydrogen som resulterer i en rød farge. Forholdet mellom disse tre stadiene fører til at fenolrød er utmerket som pH indikator (Held, 2018). Dette prinsippet vises i figur 4.

2.4.4.6 Inkubasjonstemperatur

Den optimale veksttemperaturen for *Aeromonas* varierer fra 22-37 °C, mens veksttemperaturen varierer fra 0 til 45 °C og noen arter gror ikke ved 35 °C samt ønskede temperaturområde for utførelse av biokjemiske tester er mellom 28-30 °C, mens de fleste *Aeromonas* gror best ved 35-37 °C. (Martin-Carnahan et al., 2005, s. 558)



Figur 4: Viser hvordan fenolrød reagerer med økende pH (Held, 2018)

2.4.4.7 Atmosfære

Aeromonas-arter er fakultativ anaerobe og oftest inkubert med oksygen tilstede. Det har blitt utført forsøk med anaerob inkubering i 18 timer (30 °C) etterfulgt med aerob inkubering i 24 timer (35 °C) som førte til en reduksjon i vekst av konkurrerende bakterier og derav forbedret bekreftelsen av presumptive kolonier. (Nordic-Committee-on-Food-Analysis, 2004). Ifølge NMKL-metoden vokser *Aeromonas* godt under anaerobe forhold i motsetning *Pseudomonas*-arter. (Cunliffe & Adcock, 1989, s. 2138-2139)

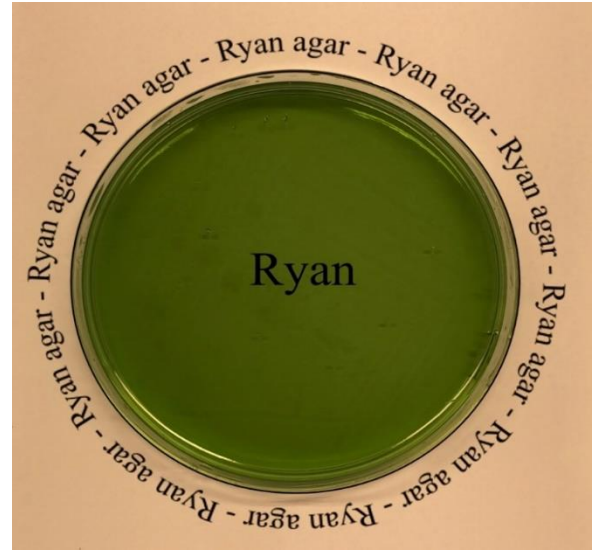
2.4.5 Utvalgte selektive medier

De tre utvalgte agarene var SAA, BSIBG og Ryan agar. Både SAA og BSIBG er ansett som et av de mest lovende medier I følge Corry Janet et al. (2012, s. 451) som sammenlignet rundt 30 forskjellige medier for isolering av *Aeromonas*. Samt SAA blir brukt i NMKL. Ryan agar bruker både ampicillin og gallesalter som selektive komponenter i motsetning til SAA som bruker kun ampicillin og BSIBG som bruker gallesalter, brilliant green og irgasan.

2.4.5.1 Ryan (*Aeromonas* agar base)

Ryan (figur 5) er et modifisert dyrkningsmedium fra mediumet «Xylose Lysine Deoxycholate» (XLD) som er laget for vekst av *Aeromonas*-arter samt Enterobacteriaceae. Ryan er egnet til bruk for både testing av vann og en rekke ulike matvarer. Selektivitetskomponentene i Ryan består av 3,0 g/l gallsalter, i tillegg skal det tilsettes 5 mg/l ampicillin. Hvis ampicillin utelates vil fortsatt *Aeromonas* kunne gro, men det vil være vanskeligere å skille dem ut fra andre tilstedeværende organismer. (Oxoid, 2019)

Ifølge produsenten Oxoid (2019) skal *Aeromonas*-koloniene være mørkegrønne, ugjennomsiktig med et mørkt senter og en diameter mellom 0,5-1,5 mm. *Pseudomonas*-arter skal være blå/grå, gjennomsiktig med en diameter opp til 0,2-5 mm, andre arter er udefinert. Ferdiglaget Ryan har en holdbarhet opp til 5 dager ved lagring 2-8 °C. Den korte holdbarheten skyldes tilsetning av ampicillin. (Oxoid, 2019) Fullstendig sammensetning av mediumet vises i tabell 4.



Figur 5: Viser hvordan Ryan ser ut, uten påvist vekst

Tabell 4: Viser sammensetning og omgivelsesfaktorer av mediumet

Composition g/L	RYAN
Proteose peptone	5,0
Gjærekstrakt	3,0
L. Lysine monohydrochloride	3,5
L. Arginine monohydrochloride	2,0
Sodium chloride	5,0
Agar	12,5
Ampicillin	0,010 (tilsettes)
d-Xylose	3,75
Bile salt no.3	3,0
sukkeralkoholer (inositol og sorbitol)	5,5
lactose	1,5
Sodium thiosulphate	10,67
Ferric ammonium citrate	0,8
Bromothymol blue	0,8
Thymol blue	0,04
Distilled or deionised water	1000,0 ml
pH i medium	8,0 +/- 0,2
Innkuberingstemperatur	30-35°C fram til 24 timer
Innkuberingstid	24 h

2.4.5.2 Stivelse Ampicillin Agar (SAA)

SAA (figur 6) er utviklet for isolering av *Aeromonas*-arter fra næringsmidler. I følge «Nordisk metodikkomité for næringsmidler» (Nordic-Committee-on-Food-Analysis, 2004) anvendes mediet til kvantitativ bestemmelse av mesofile *Aeromonas*. Den selektive komponenten i dette mediet er tilsatt antibiotikum. Differensiering av kolonier som vokser på SAA baserer seg på stivelsesfermentering som kan detekteres ved hjelp av pH-indikatoren fenolrød som blir gul ved dannelse av syre og rød ved dannelse av basiske komponenter. Ifølge produsenten skal *Aeromonas*-kolonier være gule / honningfargede kolonier, 2-3 mm i diameter og omringet av en lys sone. Eventuelt kan *Aeromonas*-arter verifiseres ved tilsetning av ca. 5 ml lugols jodoppløsning til hver plate. Dette skal gi koloniene en klar sone av hydrolysert stivelse mot en svart bakgrunn. Presumtive *Aeromonas*-kolonier må plukkes raskt siden jod er raskt dødelig for cellene. Dette har vist seg å være svært vanskelig i praksis siden koloniene rask oppløses eller løsner fra underlaget (Hoel, 2019). Ferdig tilberedt har SAA en holdbarhet på 7 dager ved 5 +/- 3 °C. (Corry Janet et al., 2012, s. 930-932; *Starch ampicillin agar (SAA)*, 2003) Fullstendig sammensetning av SAA vises i tabell 5.



Figur 6 viser hvordan SAA ser ut, uten påvist vekst

Tabell 5: Viser sammensetning og omgivelsesfaktorer av mediumet.

Composition g/L	SAA
Beef extract	1,0
Proteose peptone no. 3a	10,0
Sodium chloride	5,0
Phenol red, sodium salt	0,027
Agar	15,0
Soluble starch reagent grade	10,0
Ampicillin, sodium salt	0,011
Distilled or deionised water	1000,0 ml
pH i medium	7,4 +/- 0,2
Innkuberingstemperatur	29°C +/- 1

2.4.5.3 BSIBG (Bile Salts Irgasan Brilliant Green agar)

BSIBG (figur 7) er en selektiv agar med tilsatt gallesalter, brilliant green og irgasan for isolering av *Aeromonas*, og er egnet til bruk for analysering av næringsmiddel og miljøprøver. Opprinnelig var BSIBG designet for isolering av *Aeromonas* i fekale prøver. BSIBG skiller seg ut fra de fleste *Aeromonas*-mediene på grunn av fravær av antibiotikum. BSIBG gjør det derfor mulig å gro ampicillin-sensitive stammer som *A. trota*. (Latif - Eugenín, Beaz - Hidalgo, & Figueras, 2016, s. 884)

Mikroorganismer som overlever selektivitetsprosessen kan differensieres ved deres evne til å bryte ned xylose. *Aeromonas*-arter kan ikke fermentere xylose, dermed kan oksidasetester utføres på kolonier som ikke produserer syre for å skille mellom de ulike artene. I følge produsenten vil både *Aeromonas*-arter og *Pseudomonas*-arter forme konvekse, glinsende, gjennomsiktige, lysegrønne kolonier (LABm, 2017a). *Aeromonas*-arter danner kolonier med størrelse mellom 0,5-3,0 mm mens *Pseudomonas*-arter danner relativt små kolonier mellom 0,5-1,0 mm. *Staphylococcus aureus* og *Escherichia coli* vokser ikke. Anbefalt inkuberingstid er mellom 18-24 timer. Ifølge produsenten har ferdigstilt BSIBG en holdbarhet opp til 7 dager ved 5 +/- 3°C, men andre kilder tyder på at BSIBG kan ha en holdbarhet opp til 4 uker. (Corry, Curtis, & Baird, 2011, s. 681; LABm, 2017a; Mycrobe, 2019) Fullstendig sammensetning av BSIBG vises i tabell 6.



Figur 7: viser hvordan BSIBG ser ut, uten påvist vekst

Tabell 6: Viser sammensetning og omgivelsesfaktorer av mediumet BSIBG.

Composition g/L	BSIBG
Beef extract	5,0
Meat peptone	5,0
Agar	11,5
d-Xylose	10,0
Bile salt no.3	8,5
2,3,40 -Trichloro-20 -hydroxydiphenyl ether (triclosan; Irgasan, Ciba-Geigy)	0,005
Sodium thiosulphate	5,44
Brilliant green	0,005
Natural red	0,025
Distilled or deionised water	1000,0 ml
pH i medium	7,0 +/- 0,2
Innkuberingstemperatur	35-37°C
Innkuberingstid	18-24 h

2.4.5.4 Andre alternative selektive medier for påvisning av *aeromonas*

Totalt sett er det rundt 30 medier som har blitt foreslått for isolering av *Aeromonas*-arter. Noen medier er egnet for avføringsprøver mens andre er mer egnet for mat eller vannprøver. (Corry Janet et al., 2012, s. 463)

Phenol Red Agar Base (PRAB) fungerer som en alternativ metode for tillaging av SAA, ved tilsetning av 10g/L stivelse og 10 mg/L ampicillin vil PRAB og SAA ha en tilnærmet lik sammensetning. Ved å anvende PRAB istedenfor å tilsette alle komponentene hver for seg vil man kunne redusere problematikken ved tillaging av mediumet SAA (Palumbo et al., 1985, s. 1028). Blant annet agaren Ampicillin Dextrin Agar (ADA) bruker ampicillin og vibrostatikum for selektivitet og dextrin som hoved-karbonkilde istedenfor stivelse som SAA bruker. (Corry Janet et al., 2012, s. 464)

Studier utført av Latif-Eugenín et al. (2016) har funnet resultater for gjenfinnings-ratio av *Aeromonas* i sjømat og vann. De utprøvde mediene var Ampicillin Dextrin Agar (ADA) Stivelse Ampicillin Agar (SAA) og Bile salt Irgasan Brilliant Green-modified (BSIBG-m). ADA fikk best gjenfinnings-ratio, mens BSIBG-m ble ansett som mest selektiv.

Gobat and Jemmi (1995) utførte testing av 7 selektive medier for identifisering av *Aeromonas* på kjøtt, fisk og skalldyr. Mediumet BSIBG ved 35°C og Ampicillin Sheep Blood Agar (ASBA) ga best resultat. BSIBG var det mest selektive mediumet samt ASBA var best for presumtiv identifisering av *Aeromonas* med, med 30 mg/L ampicillin var det veldig lett å identifisere.

2.5 Biokjemiske og molekylærbiologiske verifiseringstester

I forrige kapittel ble det beskrevet hvordan selektive dyrkningsmedier fungerer som et verktøy til å kvalifisere og kvantifisere en bestemt del av en mikroflora. Men i praksis har det vist seg at slike dyrkningsmedier ikke alltid er fullstendig selektive. Ved slike tilfeller kan enkelte andre bakterier innad en mikroflora også vokse opp på dyrkningsmediene, såkalte «falske positive». Flere studier har vist at denne problematikken også gjelder dyrkningsmediene Ryan og SAA. (Fricker & Tompsett, 1989; Mattick & J Donovan, 1999; Villari, Pucino, Santagata, & Torre, 1999)

Dyrkningsmedienes manglende selektivitetsevne danner et grunnlag for å gjennomføre verifiseringstester for å kunne konfirmere bakteriekolonier som har vokst frem. Et av de første stegene i en slik verifiseringsprosedyre kan være en gjennomførelse av en oksidasetest. *Aeromonas* er oksidasepositiv og dermed kan oksidasenegative ikke-*Aeromonas* arter skille ut. (Janet et al., 2012, s. 445-455)

For å kunne identifisere oppformerte kolonier på arts- og slektsnivå kan bakterie-DNAet fra koloniene sekvenseres, nærmere sagt en bestemt del av DNAet, nemlig 16S rRNA. Men før dette må dette husholdningsgenet først isoleres, renses og oppkopieres. For å kopiere opp genet utføres det en polymerasekjederaksjon (PCR). I etterkant utføres en gelektroforsese for å undersøke om PCR-reaksjonen var vellykket.

2.5.1 Polymerase chain reaction (PCR)

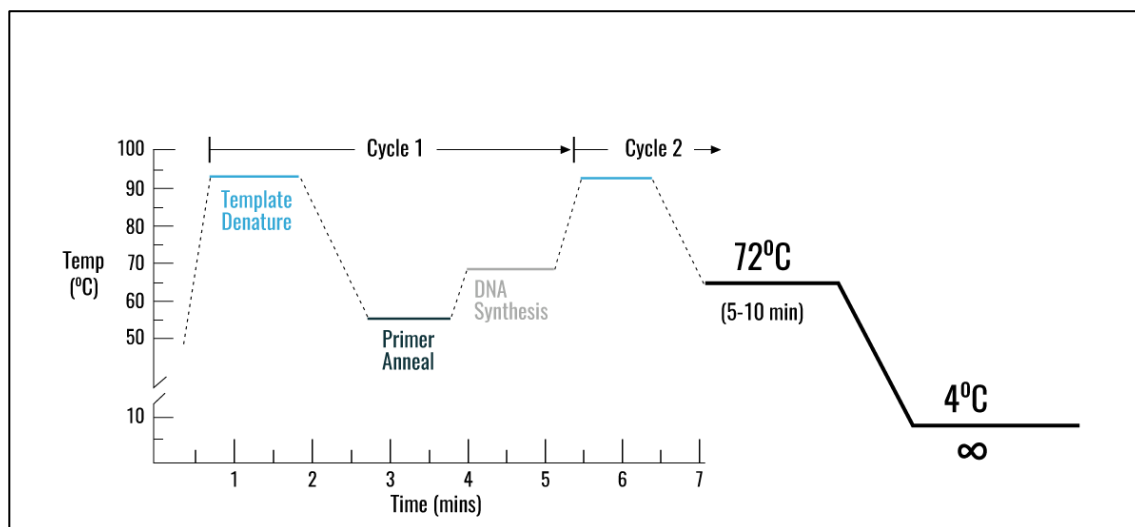
Polymerasekjedereaksjonen (PCR) er i hovedsak DNA-replikasjon *in vitro*. PCR kan kopiere segmenter av DNA til milliarder av seg selv i et prøverør, i en prosess som kalles amplifisering. Dette resulterer i en stor mengde av spesifikke gener eller andre DNA-segmenter som kan bli brukt til en rekke applikasjoner i molekylærbiologi. Ved PCR brukes enzymet DNA polymerase, som naturlig kopierer DNA molekyler (Madigan, 2015, s. 343). Det er vanlig å bruke DNA polymerase som er isolert fra den termofile bakterien *Thermus aquaticus*, også kjent som “*Taq* polymerase” (Madigan, 2015, s. 188).

Kunstig syntetiserte oligonukleotid-primere blir brukt til å initiere DNA-syntesen, disse er laget av DNA (i motsetning til å bruke RNA som cellen selv bruker som primer). PCR kopierer ikke

hele DNA-tråder men amplifiserer segmenter med opp til noen tusen basepar innad et større DNA molekyl (templatet). (Madigan, 2015, s. 343)

Stegene i PCR amplifisering av DNA er som følger (illustreres også i figur 8):

1. Templat DNA blir denaturert som følge av oppvarming
2. To kunstige DNA oligonukleotid-primere lokaliserer det ønskede DNAet på begge DNA-trådene dette sikrer at de fleste templat-tråd festes til primeren og ikke til hverandre når blandingen kjøles ned.
3. DNA-polymerase forlenger primeren ved å bruke det originale DNAet som et templat.
4. Etter en passende inkubasjonsperiode, blir blandingen varmet på nytt for å separere båndene, men denne gangen er det dobbelt så mye av det ønskede arvematerialet tilstede. Blanding blir så nedkjølt slik at primerne kan hybridiseres med de nye komplementære regionene, og hele prosessen blir repetert. (Madigan, 2015, s. 344)



Figur 8: PCR-syklus (BOOSTER, u.å.)

PCR er et kraftig verktøy som har revolusjonert alt innenfor biologi. Det er enkelt å utføre, ekstremt sensitivt, spesifikt og veldig effektivt. Per syklus blir mengden av et spesifikt segment av DNA doblet som fører til en eksponentiell vekst i mengden DNA. I praksis blir det vanligvis

utført 20-30 sykluser, som resulterer i en 10^6 - 10^9 mengde økning av den lokaliserte sekvensen. På noen få timer kan en stor mengde amplifisert DNA bli produsert med bare noen få DNA molekylar av det originale ønskede DNAet. Denne prosessen kan automatiseres i en maskin kaldt "thermocycler". Ved å bruke spesifikke primere av ca. 15 nukleotider og høye temperaturer, er PCR så spesifikt at det nesten ikke eksisterer noe "falsk primering" og gir en tilnærmet homogen prøve. (Madigan, 2015, s. 344)

2.5.2 Nukleinsyre ekstraksjon, rensning og lagring

For å utføre en PCR og lignede metoder innen molekylær biologi kreves det å ekstrahere nukleinsyrer fra en biologisk prøve. Det har blitt utviklet en rekke metoder for å utføre denne ekstraksjonen. (Schuller, Sloots, James, Halliday, & Carter, 2010, Kap.2 s. 11-12)

Nukleinsyrer finnes vanligvis ikke som frie molekylar innad bakterier, virus, sopp og protozoer. Her er de bundet i cellemembranen og celleveggen som er bygd opp av proteiner, lipider og karbohydrater. Nukleinsyrer danner selv kompleks sammen med histoner og andre proteiner for å ekstrahere nukleinsyrer som eksisterer i denne formen. Cellemembranene og veggene må derfor bli ødelagt og proteinene som er i de tidligere nevnte kompleksene må denatureres eller degraderes slik at de blir løselige, nukleinsyrene blir da frie og mulig og ekstrahere. (Schuller et al., 2010, Kap. 2 s.12)

I nyere tid har flere metoder blitt utviklet for å raskt kunne ekstrahere nukleinsyrer fra ulikt materiale, dette inkluderer blod, avføring, urin, vev, cellekulturer og plasmid DNA fra lyserte bakterieceller. Metodene fører ikke bare til en enklere og mer brukervennlig måte å utføre denne ekstraksjonen på, men fører også til god kvalitet på prøvene. (Schuller et al., 2010, Kap. 2 s. 12)

2.5.3 PCR-Amplifisering av 16S ribosomalt RNA

Fylogenetisk informative gener innad bakterier finnes som ribosomalt RNA og teknikker for å anvende disse i PCR er godt utviklet. Viktigst er at rRNA er universal og inneholder flere regioner av høyt konserverte sekvenser som er mulig å amplifisere fra alle organismer med bare noen få ulike PCR primere. I tillegg til rRNA kan gener som koder for enzymer med metabolske funksjoner bli brukt som målgener (ønsket sekvensert arvestoff). Ribosomale gener har forandret

seg over tid ettersom arter har utviklet seg fra hverandre, disse er også kjent som “orthologer”. (Madigan, 2015, s. 603)

Det prokaryote ribosomet består av flere enheter med varierende størrelse. 16S rRNA sekvensen er den mest brukte av disse for å studere husholdningsgener. Dette er da 16S rRNA finnes i nesten alle bakterier, funksjonen av 16S rRNA genet har ikke forandret seg over tid og ulikheter i sekvenser kan da være et godt mål av evolusjon innad bakterier, i tillegg er det stort nok (ca. 1500 basepar) til å analyseres. (J. Michael Janda & Abbott, 2007)

Det kan brukes kommersielle “kits” som isolerer DNA fra ulike miljøer. Fra denne prøven kan det videre brukes PCR for å oppkopiere arvestoffet. Om RNA blir isolert i stedet for DNA (for å detektere gener som blir transkribert), kan RNAet bli konvertert til komplementert DNA (cDNA) av enzymet reversert transkriptase og cDNAet gjennomgår PCR slik som forklart. (Madigan, 2015)

2.5.4 Hot-start PCR

Hot-start PCR teknikker fokuserer på å inhibere DNA polymerase reaksjoner under oppsettet av reaksjonen, ved å hemme polymerase før økning av temperatur under PCR, ikke-spesifikke amplifikasjoner blir redusert og mengden ønsket arvematerial øker. Dette oppnås ved å fysisk separere eller kjemisk inaktivere en eller flere reaksjonskomponenter frem til høyere temperaturer er oppnådd. Flere PCR-kits har inkorporert en av de flere ulike hot-start mekanismene. (Tang & Stratton, 2018, s. 333)

Det har blitt utviklet metoder som inkluderer kjemisk modifisert *Taq* DNA-polymerase og en antistoff inhibert *Taq* DNA-polymerase. Antistoffet er rettet mot det aktive sete på enzymet, dette forhindrer DNA replikasjon frem til høye temperaturer under denatureringssteget i PCR ødelegger antistoffet. Slike kjemisk modifiserte metoder krever et lengre initialt denatureringssteg en ved bruk av standard *Taq* DNA-polymerase. (Tang & Stratton, 2018, s. 333)

2.5.5 Deteksjon og analysing av PCR produkt

Målet med en PCR-reaksjon er å produsere et stort antall kopier av en bestemt DNA-sekvens med en gitt lengde som bestemmes av hvor primerne bindes til template. I motsetning til real-

time PCR der amplifiseringsprosessen overvåkes og detekteres underveis må tilstedeværelsen av ønsket PCR-produkt verifiseres når man benytter konvensjonell PCR

Det kan være flere grunner for at PCR produkt ikke eksisterer eller er av dårlig kvalitet, det kan være dårlig kvalitet av templat-DNA, for lite (eller for mye) templat-DNA, for lite sekvens homologi mellom primere og det ønskede målet, tilstedeværelse av PCR inhibitorer eller ikke oppnådde PCR forhold. (Tang & Stratton, 2018, s. 331-332)

I konvensjonell PCR, blir sluttproduktet analysert etter PCR er ferdig med bruk av elektroforese i agarosegel og ofte brukes etidiumbromid ved å feste seg til DNA for å kunne visuelt analysere arvestoffet under UV-lys. (Tang & Stratton, 2018, s. 332)

Grunnet etidiumbromids store helsefare blir det mer og mer erstattet med andre tryggere stoffer som for eksempel GelRed som oppføres som et tryggere alternativ som kan erstattes direkte uten å endre på metodikken. (Crisafuli, Ramos, & Rocha, 2015)

DNA fragmentets størrelse bestemmes ved å sammenligne størrelsen med kjente molekylære vektmarkører. Agarosegelelektroforese gir informasjon om PCR-produktets størrelse, men ikke om PCR-produktets sekvens. For å bestemme sekvensen må PCR produktene sekvenseres. (Tang & Stratton, 2018, s. 332)

Sekvensering av PCR-produktet ved å bruke Sanger sekvensering eller “next generation” sekvensering kan oppgi sekvensen på arvematerialet i prøven. Denne sekvensen kan brukes til å sammenligne med andre sekvenser og derfor gi et sikkert resultat hvilken organisme prøven stammer fra. (Tang & Stratton, 2018, s. 332)

2.5.6 Oksidasetesting

Oksidasetesting er en utbredt metode for å skille mellom oksidase positive og negative bakterier. Organismer som inneholder cytokromer, produserer et intracellulært oksidaseenzym. Dette enzymet er til for å katalysere oksidasjonen av cytokrom c. Mikroorganismer deles derfor inn i to grupper, oksidase positive som har cytokrom c som en del av deres respirasjon og oksidase negative som ikke har det. Oksidase positive bakterier har enten cytokrom oksidase eller indolfenol oksidase, begge disse brukes for å katalysere transport av elektroner fra NADH til elektron akseptorer. Vanligvis er det bare aerobe organismer, med muligheten til å bruke oksygen som endelig elektronakseptor som er oksidase positive. (Aryal, 2018)

3. Materialer og metode

I den praktiske delen av denne oppgaven ble de to utvalgte dyrkningsmediene (BSIBG og Ryan), samt stivelse ampisillin agar, testet i flere ulike forsøk der hovedfokus har vært evne til selektivitet for *Aeromonas*.

I det første forsøket ble det dyrket opp og beskrevet vekst av et utvalg *Aeromonas*-arter og et utvalg av ikke-*Aeromonas* arter på alle tre dyrkningsmedier. Videre ble dyrkningsmediene testet med næringsmiddelprøver som hadde en blandet mikroflora. Det skulle utredes hvorvidt mediene klarte å isolere eventuelle *Aeromonas*-arter, og om det var vekst av andre konkurrerende ikke-*Aeromonas* arter. I tillegg ble det tatt analyser av kunstig kontaminerte næringsmiddelprøver for å undersøke gjenfinningsgraden av *Aeromonas*.

Til slutt ble det gjennomført en biokjemisk og molekylærbiologisk verifisering av kolonier fra næringsmiddelprøvene.

3.1 Tillaging av dyrkningsmedier

I forbindelse med de ulike forsøkene ble det tillaget Ryan, BSIBG, SAA, PCA, MRSA, TSB og peptonvann.

3.1.1 AEROMONAS agar (Ryan)

I dette forsøket ble det brukt *Aeromonas* medium base (Oxoid), heretter omtalt som «Ryan» agar. Det ble brukt 59g pulver per liter avionisert vann.

Blandingen ble kokt opp ved 100 °C i en autoklav. Agaren ble kjølt ned til 47 °C i et vannbad. En ampulle ampisillin (ampicillin selective supplement, Oxoid) ble tilsatt 2,0 ml sterilisert avionisert vann og ristet til pulveret var helt oppløst. Dette medfører en endelig ampicillinkonsentrasjon i mediet på 5 mg/L. Det ble kun laget en batch med 5 mg/L ampisillin, på et senere tidspunkt ble agaren tillaget med en dobbel dose ampisillin, det vil si 10 mg/L.

Mediet måtte tørkes før bruk da det ble oppdaget mye kondens både på petriskålens lokk og på selve agaren. Tørkingen ble gjort ved å åpne lokket litt og stille skålene inn i et inkubasjonsskap ved 37°C i ca. 30 minutter rett før bruk.

3.1.2 Bile Salts Irgasan Brilliant Green agar (BSIBG)

45,5 g/L avionisert vann Bile Salts Irgasan Brilliant Green agar (BSIBG, LabM) ble blandet godt, slik at pulveret løste seg opp. mediet ble så oppvarmet i en autoklav (100 °C i 10 min). Den ferdigkokte agaren ble så overført til et vannbad med temperatur på ca. 47°C. Når agaren var temperert ble den helt ut i petriskåler.

Ved tillaging av den første batchen med BSIBG ble det observert en tydelig utfelling av komponenter etter kokeprosessen. Tillagingen av BSIBG agaren ble gjentatt på grunn av dette avviket. Tidsperioden for kokeprogrammet ble oppjustert fra 10 min. til 15 minutter, og i tillegg ble tempereringstiden nedjustert. Det noteres at BSIBG brukt i denne oppgaven hadde overskredet sin holdbarhetsdato.

3.1.3 Starch Ampicillin agar (SAA)

SAA ble tillaget i henhold til den standardiserte metoden NMKL 150.

I dette forsøket ble det brukt;

- 1 g/L Beef extract (BBL™)
- 10 g/L Proteose pepton (Oxoid)
- 5 g/L Natriumklorid (VWR)
- 0,027 g/L Phenol red, sodium salt (Sigma-Aldrich)
- 15 g/L Agar «Agar bacteriological, Agar No1» (Oxoid)
- 10 g/L Soluble starch, reagent grade (Difco™)
- 0,01 g/L Ampicillin, sodium salt (Sigma-Aldrich)
- Avionisert vann.

Dette resulterer i en endelig ampicillinkonsentrasjonen på 10 mg/L.

3.1.4 Tryptic soy agar (TSA)

Det ble blandet 40 g Tryptic soya gar (TSA, Oxoid) per liter avionisert vann. Mediumet ble ristet før det ble kokt opp i en autoklav ved 100 °C i 10 minutter og senere autoklavert ved 121 °C i 15 minutter.

Etter Autoklavering ble kolbene temperert i et vannbad ved 47 °C i 45 minutter før agaren ble overført til petriskåler og satt til tørking.

3.1.5 Plate Count Agar (PCA)

17,5 g Plate count Agar (PCA, Oxoid) ble brukt per liter avionisert vann. Det ble så mikset, kokt opp og så autoklavert ved 121 °C i 15 minutter.

3.1.6 De man, Rogosa, Sharpe (MRSA)

Det ble blandet 62 g de man, Rogosa, Sharpe (MRSA, Oxoid) per liter vann. Mediet ble så ristet, kokt opp og autoklavert 121°C i 15 minutter.

3.1.7 Tryptone soya broth (TSB)

Det ble blandet 30 g Tryptic soya broth (TSB, Oxoid) per liter avionisert vann.

Etter en rask miksing ble mediet autoklavert ved 121°C i 15 minutter.

3.1.8 Peptonvann

8,5 g natriumklorid (VWR) og 1,0 g pepton (Oxoid) ble brukt per liter avionisert vann. Etter en rask miksing ble den autoklavert ved 121°C i 15 minutter.

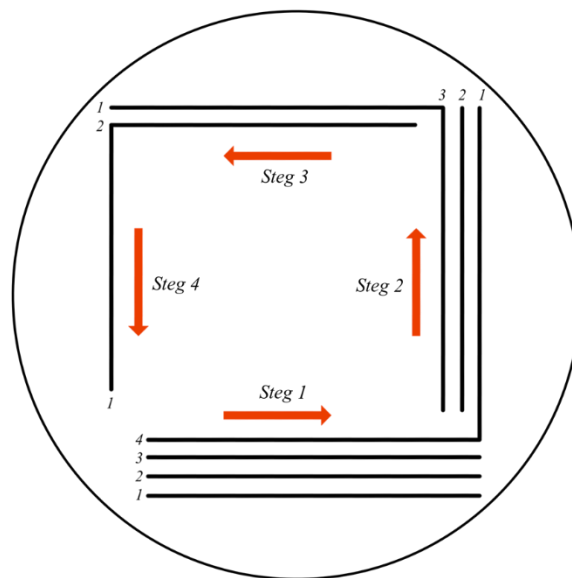
3.2 Oppdyrking av kjente bakteriestammer

Tabell 7 viser en liste over innkjøpte bakterie- og miljøisolater (tidligere isolert fra sushi) som ble brukt til å påvise vekst og gi en visuell dokumentasjon på de ulike mediene. De ulike kjente *Aeromonas*- og ikke-*Aeromonas* isolater ble tint og overført til tryptone soya agar (TSA). Av de 20 isolatene var 18 flytende kulturer som kunne podes over direkte med en podeøse. Disse isolatene ble podet over med en standardisert teknikk, som vist i figur 9 De to siste isolatene var fryst ned med glasskuler, og to slike kuler ble overført til hver sin petriskål og rullet rundt på agaren. Etter en liten tid ble kulene fjernet og samtlige petriskåler ble inkubert ved 30°C i 24t.

Tabell 7: Anvendte bakterieisolater

Art	Kilde
<i>Aeromonas hydrophila</i>	CCUG 14551
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Miljøisolat (A538)
<i>Aeromonas caviae</i>	CCUG 25939
<i>Aeromonas caviae</i>	Miljøisolat (A507)
<i>Aeromonas veronii biovar veronii</i>	CCUG 27821
<i>Aeromonas veronii biovar sobria</i>	CCUG 30360
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (SU2)
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Miljøisolat (SU55-4)
<i>Aeromonas bestiarum</i>	Miljøisolat (SU14-3)
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (B10-054)
<i>Aeromonas media</i>	Miljøisolat (A539)
<i>Aeromonas dhakensis</i>	Miljøisolat (A536)
<i>Aeromonas piscicola</i>	Miljøisolat (SU58-3)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCUG 2080
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCUG 369
<i>Staphylococcus aureus</i>	CCUG 41582
<i>Escherichia coli</i>	CCUG 49263
<i>Brochothrix thermospacta</i>	CCUG
<i>Enterobacter sp.</i>	Miljøisolat (A511)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	CCUG 134521

Etter oppdyrking av isolater på TSA ble det plukket en koloni fra hvert isolat og podet over på de tre selektive mediene for *Aeromonas*. Overføring ble gjennomført med teknikken som vist i figur 9. Først ble det kun brukt en podeøse for denne teknikken, men senere ble samme teknikk utført, der en ny podeøse ble brukt for hvert steg. Denne endringen ble gjort da den tidligere metodikken førte til sammenvokste kolonier og svært få enkeltkolonier. Uten enkeltkolonier ble det vanskelig å se fargeomslag eller typisk koloniutseende. Etter 24 og 48 timer inkubering ved 30°C ble det tatt standardiserte bilder av petriskålene. Dette ble gjort både før og etter endring av utstrykningsmetodikk, for å kunne sammenligne de to teknikkene.



Figur 9: Utstrykningsteknikk brukt i forsøket

Figuren viser hvilken teknikk som ble brukt ved utstrykning av isolater til TSA.

- 1. Podes over fra mediet til platen, fire linjer blir laget med podeøsen*
- 2. Tre linjer strykes ut, der kun den første linjen har kontakt med en av linjene fra steg 1*
- 3. To linjer strykes ut med lik teknikk fra steg 2*
- 4. En linje strykes ut med lik teknikk fra steg 2*

3.3 Sammenligning av medienes evne til å isolere *Aeromonas* fra en blandet mikroflora

I dette forsøket skulle mulige *Aeromonas* arter isoleres fra fem ulike næringsmidler med en blandet mikroflora for å sammenligne medienes evne til å isolere *Aeromonas* fra ulike floraer og analysere forskjeller mellom Ryan, BSIBG og SAA. Disse var: Sushi loin, kokte reker, ishavsrye, alfalfaspirer og salatblanding som vist i tabell 8.

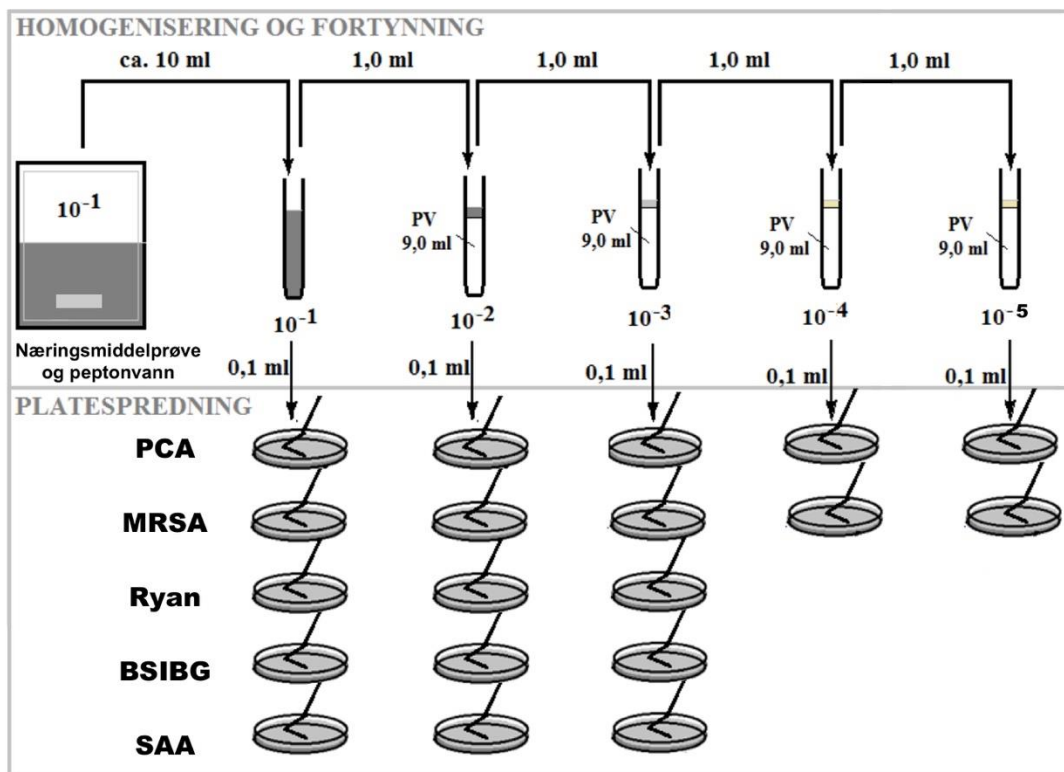
Tabell 8: Utvalgte næringsmidler brukt i forsøket og deres opprinnelse, samt holdbarhet.

Næringsmiddel	Opprinnelse
Ishavsrye	Fra ferskvaredisk. Gjenstående holdbarhet: ikke definert
Kokte reker	Fra ferskvaredisk. Gjenstående holdbarhet: ikke definert
Laks	Fra Coop, pakket i beskyttende atmosfære. Gjenstående holdbarhet: ikke definert
Sushiloin	Fra Frøya, vakuumpakket. Merket med siste forbruksdag, gjenstående holdbarhet: 3d
Salatblanding	Fra Bama (vasket). Merket med siste forbruksdag, gjenstående holdbarhet: 0d
Alfalfaspirer	Økologiske, fra Norske spirer (uvasket). Merket med siste forbruksdag, gjenstående holdbarhet: -1d

10 g av hvert næringsmidlene ble aseptisk overført til en stomacher-pose før det ble tilsatt 90 gram peptonvann for å lage en 10^{-1} fortynning. Denne ble så blandet i en stomachermaskin (IUL masticator Panoramic) i 60 sekunder for å lage en homogen blanding. Det ble tillaget tre paralleller per næringsmiddel (parallell A, B og C).

10 ml fra hver av de homogeniserte prøvene ble overført til et prøverør. Det ble så laget en fortynningsserie, videre ble det overført 0,1 ml fra fortynningene til Ryan, BSIBG og SAA og strøket ut. Metodikken illustreres i figur 10. Plate count Agar (PCA, Oxoid) ble benyttet for å kvantifisere det totale kimtallet i prøvene, de man, Rogosa, Sharpe agar (MRSA, Oxoid) ble brukt for å påvise mulige melkesyrebakterier i produktene. *Aeromonas*-mediene ble inkubert ved

30 °C og avlest etter 24 og 48 timer. PCA ble inkubert ved 30 °C og avlest etter tre dager og MRSA ble inkubert anaerobt ved 25 °C og avlest etter fem dager.



Figur 10: Flytskjema for fortynning og utplating av næringsmiddelprøver

3.4 Kvantifisering av *Aeromonas* fra kunstig kontaminerte laksefileter

Laks ble kontaminert med et inokulum bestående av *A. hydrophila* (A538), *A. salmonicida* (SU2) og *A. caviae* (A507). Én koloni fra hver stamme ble overført til 7 ml Tryptic soya broth (TSB) og inkubert i risteinkubator i 24 timer ved 30 °C og 150 rpm. Etter inkubering ble «optical density» (OD) målt ved 600nm der 1 ml av kulturen ble tilsatt en kyvette sammen med en blindprøve av TSB i et spektrofotometer (Shimadzu UV-spectrophotometer).

En omregningskalkulator ble benyttet for å konvertere de målte OD-verdiene til cfu/ml for å bestemme konsentrasjonen på kulturen som ble brukt til å kontaminere laksen Labm (2017b) [<https://www.chem.agilent.com/store/biocalculators/calcODBacterial.jsp>].

Inokulmet ble så fortynnet til det ble oppnådd fire ulike konsentrasjoner på 10^6 (log 6), 10^5 (log 5), 10^4 (log 4) og 10^3 (log 3) cfu/ml.

Videre i forsøket ble det tatt bakteriologiske analyser av:

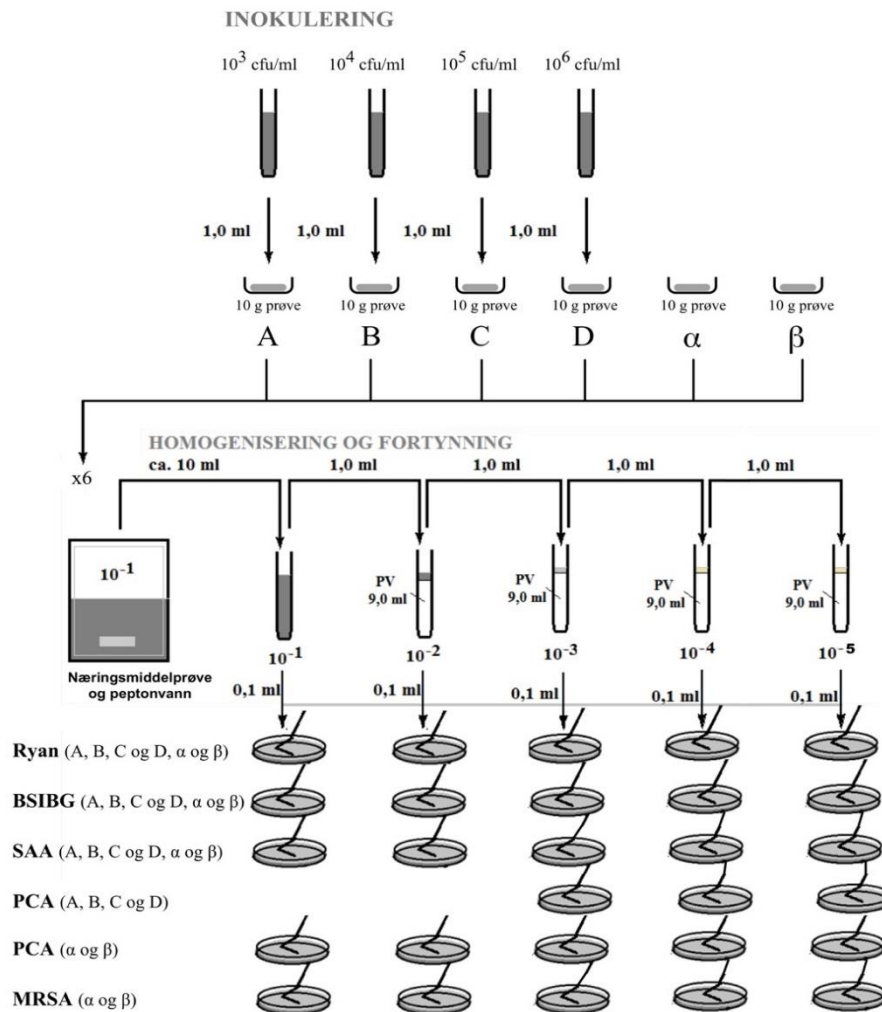
1. Inokulum, alle konsentrasjoner
2. To parallelle lakseprøver, (referanseprøve, α og β)
3. De ulike prøvene kontaminerte laks (Prøve A, B, C og D)

Den faktiske konsentrasjonen til inokulumet ble bestemt ved å plate ut de ulike fire tilnærmede konsentrasjonene på TSA, og platene ble inkubert ved 30 °C og avlest etter 24 timer.

Fire Laksebitar á 10 g ble tilsatt 1 ml av hver sin konsentrasjon med inokulum. Prøve A ble tilsatt inokulum med konsentrasjon 10^3 , prøve B - 10^4 , prøve C - 10^5 og prøve D - 10^6 . Det ble også tillaget to referanseprøver med samme teknikk, men uten tilsetning av inokulum. Laksebitene som ble tilsatt inokulum ble først snittet i overflaten for å sikre at kulturen kunne trenge inn i prøvene. Prøvene ble så liggende i romtemperatur i 30 minutter og i kjøleskap i 30 minutter.

Alle prøvene ble homogenisert med peptonvann og videre metode for fortynning og utplating var lik som beskrevet i forrige forsøk. Flytskjema for prosessen kan ses i figur 11.

Ryan, BSIBG og SAA ble inkubert ved 30 °C og avlest etter 24 og 48 timer. PCA ble inkubert ved 30 °C, MRSA ved 25 °C og avlest etter henholdsvis tre og fem dager.



Figur 11: Flytskjema for kunstig kontaminering av lakseprøver.

3.5 Identifisering av kolonier fra de selektive dyrkningsmediene

For å kunne identifisere kolonier og få utdypende resultater for *Aeromonas*-medienes effekt, ble et utvalg kolonier plukket og tatt med videre for biokjemisk og molekylærbiologisk testing.

3.5.1 Plukking av kolonier og rensing av DNA

Kolonier fra forsøket «Sammenligning av mediene evne til å isolere *Aeromonas*» ble studert og 52 kolonier av interesse ble overført til TSA og oppdyrket i 24 timer ved 30 °C. Det ble også plukket 32 kolonier fra «kvantifisering av *Aeromonas* fra kunstig kontaminerte laksefileter».

Koloniene ble valgt ut fra forskjeller i utseende, størrelse, og om utseende samsvarte med produsentopplysningene om typisk koloniutseende for *Aeromonas* på mediene. Et mindre utvalg kolonier som avviker fra disse betingelsene ble også analysert for å muligens forsterke eller motsi leverandørens påstander om koloniutseende.

Alle koloniene ble testet med en oksidasetest (BD BBL™ DrySlide™) før en koloni fra TSA ble overført til et prøverør med 7 ml TSB og inkubert ved 30 °C i 24 timer. Etter inkubering ble 1 ml av kulturen overført til et eppendorfrør og sentrifugert i fem minutter ved 8000 rpm (ThermoScientific Heraeus megafuge 8R). Supernatanten ble fjernet før pelleten med cellemateriale ble fryst ned ved -20 °C. Videre ble prosedyre for “GenJET Genomic DNA Purification Kit” (ThermoFisher), protokoll «D. Gram-negative Bacteria Genomic DNA Purification Protocol» fulgt for å isolere DNA fra prøvene.

3.5.2 Polymerase chain reaction (PCR) av 16S rRNA for identifisering av isolater fra næringsmiddelprøvene

For å kunne identifisere de ulike koloniene på slekts- og muligens artsnivå ble det utført en polymerase kjedereaksjon (PCR). I dette forsøket ble det amplifisert et ca. 1150 bp fragment av V3-regionen av 16S rRNA.

I dette forsøket ble det brukt “HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen)” kit for PCR og “dNTP mix, PCR grade (Qiagen) ut ifra dette ble det laget en mastermiks med konsentrasjoner slik beskrevet i tabell 9.

Tabell 9: Konsentrasjoner av reagenser i mastermiks

Ingredienser	Endelig konsentrasjon
PCR-buffer (Qiagen)	1x
dNTP miks (Qiagen)	200 µM
Primer 338F (5'-3') (Sigma Aldrich) ACTCCTACGGGAGGCAGCAG	0,2 µM
Primer 1492R (5'-3') (Sigma Aldrich) TACGGYTACCTTGTTACGACT	0,2 µM
HotstarTaq DNA polymerase (Qiagen)	2,5 enheter/reaksjon.
Nukleasefritt vann (Ambion)	-

45 µl av mastermiksen ble pipetert i en PCR-plate sammen med 5 µl DNA. PCR ble utført i en c1000 Termocycler (BioRad) ved følgende program:

1. 15 minutter ved 95°C
2. 1 minutt ved 95°C
3. 30 sekunder ved 58°C
4. 1 minutt ved 72°C
5. Steg 2, 3 og 4 ble gjennomført totalt 30 ganger
6. 5 minutter ved 72°C
7. Prøvene ble nedkjølt til 4°C.

3.5.3 Agarose gelelektroforese

10 µl PCR-produkt så overført til vær sitt merkede eppendorfrør og tilsatt 2 µl lastebuffer. Samtidig ble det produsert en agarosegel ved å blande sammen 2,7 g LE Agarose (Lonza) og 150 ml Tris-acetate-EDTA buffer (TAE-buffer) som resulterte i en konsentrasjon på 1,8 % agarose i gelen. Blandingen ble varmet opp i en mikrobølgeovn til store bobler ble dannet. Etter en kort avkjøling ble det tilsatt 8 µl GelRed (Qiagen) før støping. Gelen ble overført til et bufferkar og karet ble fylt opp med TAE-buffer til hele gelen var dekket. De første og siste brønnene i hver rad i gelene ble tilsatt 6 µl "1 Kb Plus Ladder (Qiagen)" før resterende brønner ble applisert med 10 µl prøve i systematisk rekkefølge. Gelen ble så tilkoblet en spenningskilde og ble kjørt i 65 minutter ved 110 volt før bilder av gelen ble tatt med en «G-box» (G:BOX Chemi XRQ gel doc system). Elektroforese ble kjørt under to ulike betingelser: 110 V i 65 minutter og 110 V i 80 minutter.

3.5.4 Rensing, kvantifisering av PCR produkt

DNA-produktene ble rensset før sekvensering ved hjelp av «GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Scientific) i henhold til produsentens protokoll for «DNA purification using centrifuge». Konsentrasjonen av prøvene ble målt spektrofotometrisk ved å bruke en «BioTek PowerWave HT». To paralleller av hver prøve ble målt før gjennomsnittet ble regnet ut. En konsentrasjon mellom 30-80 ng/μl var ønskelig, prøver med konsentrasjoner over dette måtte fortynnes. Alle prøver som krevde fortynning ble overført til et nytt sterilt eppendorffrør og tilsatt en utregnet mengde nukleasefritt vann (Ambion) før 5 μl fra hver av prøvene ble overført til ett nytt sterilt eppendorffrør markert med en tilsendt strekkode og sendt inn til Eurofins Genomics i Tyskland for «lightrun Sequencing».

3.5.5 Identifisering av sekvenserte isolater

Når 16S rRNA sekvensene var analysert og resultatene ferdig, ble sekvensene til isolatene sammenlignet med referansesekvenser ved hjelp av verktøyet nucleotide BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome] Søket ble filtrert ved å hake av “uncultured/environmental sample sequences” og føre inn “bacteria (taxid:2)” under “Organism”

3.5.5.1 Statistisk analyse

Enveis variansanalyse (ANOVA) ble benyttet for å teste for forskjeller i kimtall mellom de tre selektive mediene, SAA, BSIBG og Ryan. Analysen ble utført på log-transformerte data (for å oppnå lik varians og normalfordeling) i programvaren SPSS statistics (versjon 25, IBM) med Signifikansnivå 0,05

4. Resultater

I dette kapittelet presenteres resultatene fra oppdyrkingen av kjente bakteriestammer og sammenligningen av de tre mediene med både naturlig og kunstig kontaminerte prøver. Til slutt presenteres resultater fra den molekylærbiologiske verifisering. De tre mediene som ble sammenlignet er Stivelse Ampicillin agar (SAA), *Aeromonas* agar (Ryan) og Bile Salt Irgasan Brilliant Green agar (BSIBG).

Flere av resultatene blir visuelt framstilt i form av standardiserte bilder som ble tatt i sammenheng med forsøkene. Alle bildene som framkommer i dette kapitelet er egne.

4.1 Oppdyrking av kjente bakteriestammer på de selektive mediene

Det ble påvist vekst av samtlige *Aeromonas*-isolater på dyrkingsmediene SAA, BSIBG og Ryan, som vist i tabell 10. Når det gjelder de 7 ikke-*Aeromonas* artene, ble det påvist noen ulikheter i vekst på dyrkningsmediene. *S. aureus* og *B. thermospacta* vokste ikke på noen av mediene. *E. coli* ble kun påvist på Ryan og BSIBG, mens *Enterobacter* vokste på alle dyrkingsmediene. *S. putrefaciens* vokste ikke på SAA og BSIBG. Denne bakterien vokste kun på Ryan agar som hadde en enkel dose med ampicillin (5 mg/L).

Tabell 10: Vekst av *Aeromonas* og ikke-*Aeromonas* isolater på de ulike mediene. Ryan agar er tilsatt 10 mg/L ampicillin.

+++ mye vekst, ++ nokså mye vekst, + lite vekst, - ikke vekst

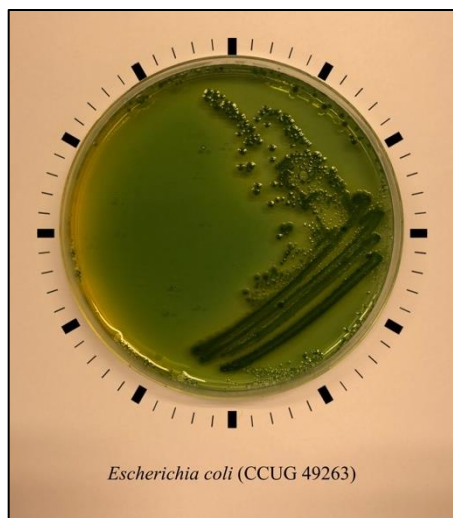
Art	Ryan	SAA	BSIBG
<i>A. hydrophila</i> (CCUG 14551)	+++	+++	+++
<i>A. hydrophila</i> (miljøisolat A538)	+++	+++	+++
<i>A. caviae</i> (CCUG 25939)	+++	+++	+++
<i>A. caviae</i> (miljøisolat A507)	+++	+++	+++
<i>A. veronii</i> biovar <i>veronii</i> (CCUG 27821)	+++	+++	+++
<i>A. veronii</i> biovar <i>sobria</i> (CCUG 30360)	+++	+++	+++
<i>A. salmonicida</i> (miljøisolat SU2)	+++	+++	+++
<i>A. salmonicida</i> (miljøisolat SU55-4)	+++	+++	+++
<i>A. bestiarum</i> (miljøisolat SU14-3)	+++	+++	+++
<i>A. media</i> (miljøisolat A539)	+++	+++	+++
<i>A. media</i> (miljøisolat B10-054)	+++	+++	+++
<i>A. dhakensis</i> (miljøisolat A536)	+++	+++	+++
<i>A. piscicola</i> (miljøisolat SU58-3)	+++	+++	+++
<i>P. aeruginosa</i> (CCUG 2080)	+++	+++	+++
<i>P. fluorescens</i> (CCUG 369)	+++	+++	+++
<i>S. aureus</i> (CCUG 41582)	-	-	-
<i>E. coli</i> (CCUG 49263)	++	-	+
<i>B. thermospacta</i> (CCUG	-	-	-
<i>Enterobacter</i> (miljøisolat A511)	+++	+++	+++
<i>S. putrefaciens</i> (CCUG 134521)	(+)*	-	-

* *S. Putrefaciens* vokste kun på Ryan med enkel dose ampicilin (5 mg/l)

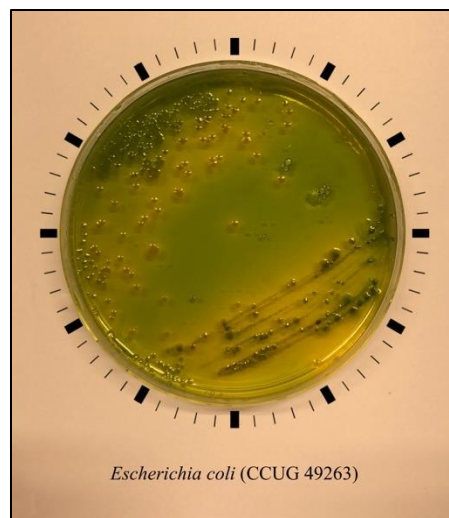
4.1.1 Betydningen av ampicillin-konsentrasjonen i Ryan agar

Ved oppdyrkingen av kjente ikke-*Aeromonas* arter på de ulike mediene, var en av de største påviste forskjellene at *E. coli* vokste godt på Ryan, men ble sterkt inhibert på BSIBG og helt inhibert på SAA. I tillegg ble det påvist vekst av *S. putrefaciens* på Ryan med en enkel dose ampicillin (5 mg/L). På grunn av dette ble det tillaget Ryan agar med en dobbel dose ampicillin (10 mg/L) for å optimalisere dyrkingsmediets selektivitet. Figur 12 og 13 viser at den økte mengden tilsatt ampicillin resulterte i en tydelig inhiberende effekt på *E. coli*.

S. putrefaciens ble fullstendig inhibert og det ble ikke påvist vekst. Hos de andre bakterieartene, både *Aeromonas* og alle ikke-*Aeromonas*, ble det ikke påvist noen merkbar forskjell i vekst av den økte ampicilinkonsentrasjonen.



Figur 12: *Escherichia coli* på Ryan agar med enkel dose ampicillin etter 48t inkubasjon



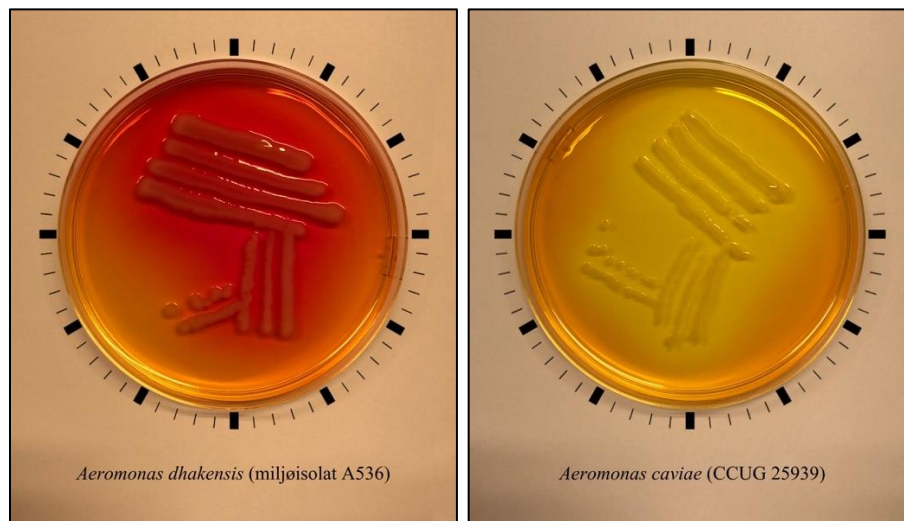
Figur 13: *Escherichia coli* på Ryan agar med dobbel dose ampicillin etter 48t inkubasjon.

Det ble bestemt at Ryan agar med 10 mg/L ampicillin skulle brukes for alle resterende forsøk.

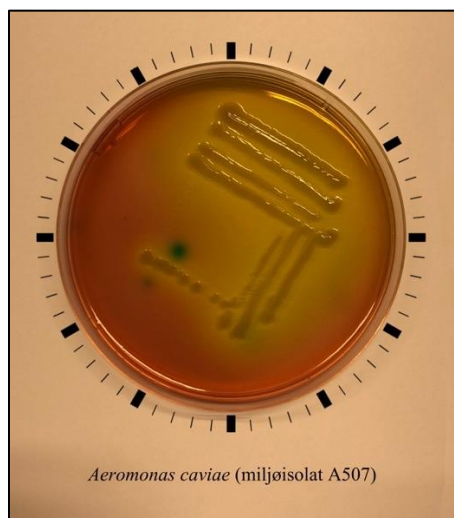
Det betyr at alle resultater som presenteres heretter i oppgaven er basert på at Ryan inneholder 10 mg/L ampicillin.

4.1.2 Bildedokumentasjon av typiske *Aeromonas* kolonier

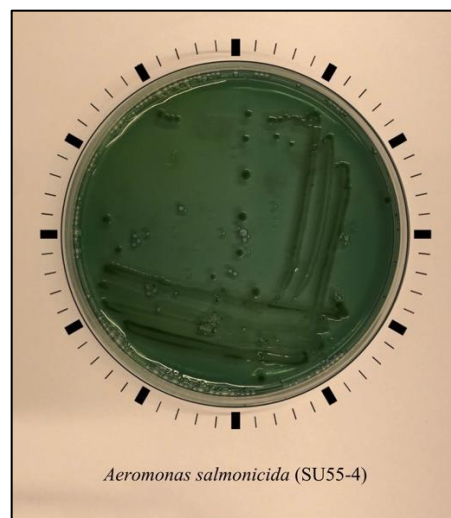
Det ble tatt standardiserte bilder av samtlige bakteriestammer på de ulike mediene etter inkubasjon. I figur 14 framkommer det typiske utseende til to *Aeromonas*-isolater på SAA. Koloniene til venstre er røde og ugjennomsiktig mens i bilde til høye er de gule og gjennomsiktig og begge hadde en glinsende overflate. Det dannes en rød eller gul sone rundt koloniene som avhenger av endring i pH. Fargeforandringen av pH-indikatoren fenolrød kommer tydelig frem i figur 14. Vekst av *Aeromonas caviae* fører til at pH-verdien synker og danner en gul sone rundt koloniene på SAA. Hos *Aeromonas dhakensis* er det derimot observert en rød sone rundt koloniene som skyldes en pH-økning. *Aeromonas*-kolonier på BSIBG blir glinsende gråbrune med en gul sone (figur 15). På Ryan agar blir *Aeromonas*-koloniene mørkegrønne med et svart sentrum, som vist i figur 16. Flere bilder av typisk *Aeromonas*-utseende på de ulike dyrkingsmediene er vist i vedlegg 1.



Figur 14: Typisk utseende av *Aeromonas* på SAA etter 24t inkubasjon ved 30° C.



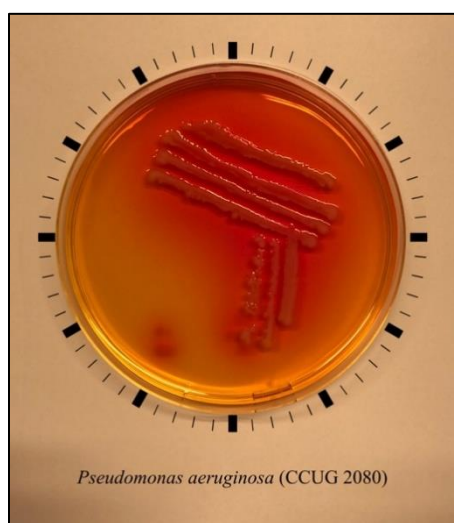
Figur 15: *Aeromonas caviae* er et eksempel på typisk utseende av *Aeromonas* på agaren BSIBG etter 24t inkubasjon



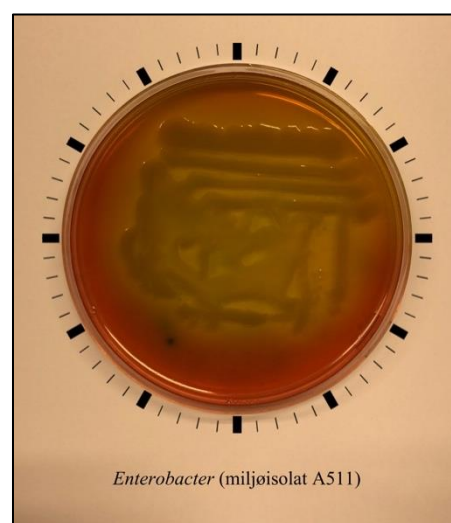
Figur 16: *Aeromonas salmonicida* er et eksempel på typisk utseende av *Aeromonas* på agaren Ryan etter 24t inkubasjon

4.1.3 Bildedokumentasjon av ikke-*Aeromonas* arter med lignende kolonier som *Aeromonas*

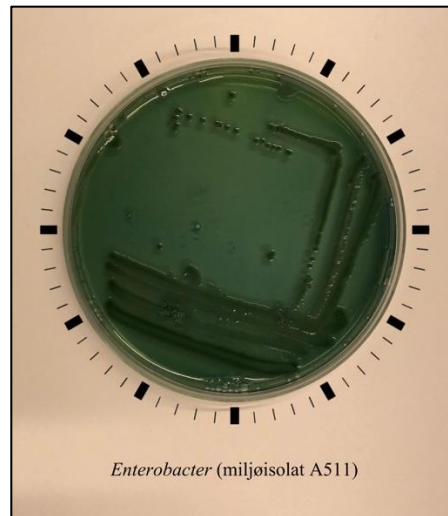
Etter oppdyrking av 7 forskjellige ikke-*Aeromonas* arter på SAA, BSIBG og Ryan, ble det funnet ut at de fleste ikke kan differensieres fra typiske *Aeromonas* kolonier. Figur 17, 18 og 19 illustrerer dette problemet.



Figur 17: *Pseudomonas aeruginosa* viser visuell likhet med *Aeromonas* på SAA etter 24t inkubasjon



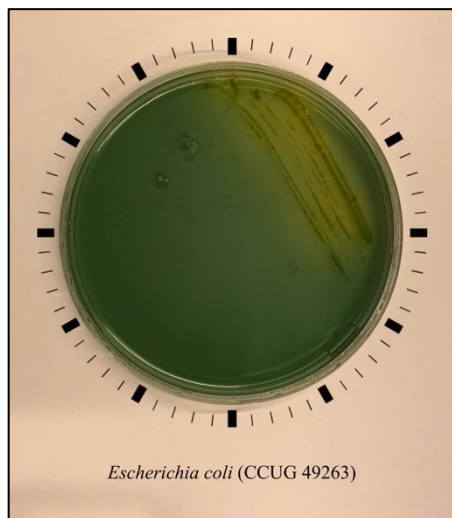
Figur 18: *Enterobacter* viser visuell likhet med *Aeromonas* på BSIBG etter 24t inkubasjon



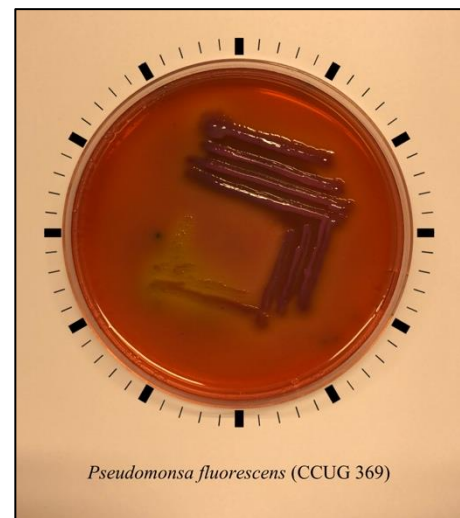
Figur 19: Enterobacter viser visuell likhet med Aeromonas på Ryan etter 24t inkubasjon

4.1.4 Bildedokumentasjon av enkelte ikke-Aeromonas arter med kolonier som skiller seg fra Aeromonas

Det ble kun funnet en merkbar forskjell i utseende hos enkelte ikke-*Aeromonas* arter. Disse var *E. coli* på Ryan agar, vist i figur 20, som danner en gul sone rundt koloniene og *P. fluorescens* på BSIBG som danner tydelige lilla kolonier. Det anmerkes at det var ingen ikke-*Aeromonas* kolonier som tydelig skilte seg ut på SAA. Det er likevel verdt å nevne at alle ikke-*Aeromonas* artene som faktisk vokste på SAA dannet en tydelig rød sone rundt koloniene.



Figur 20: Escherichia coli viser visuell differanse med Aeromonas på Ryan etter 24t inkubasjon



Figur 21: Pseudomonas fluorescens viser visuell differanse med Aeromonas på BSIBG etter 24t inkubasjon

4.2 Sammenligning av mediernes evne til å isolere *Aeromonas* fra en blandet mikroflora

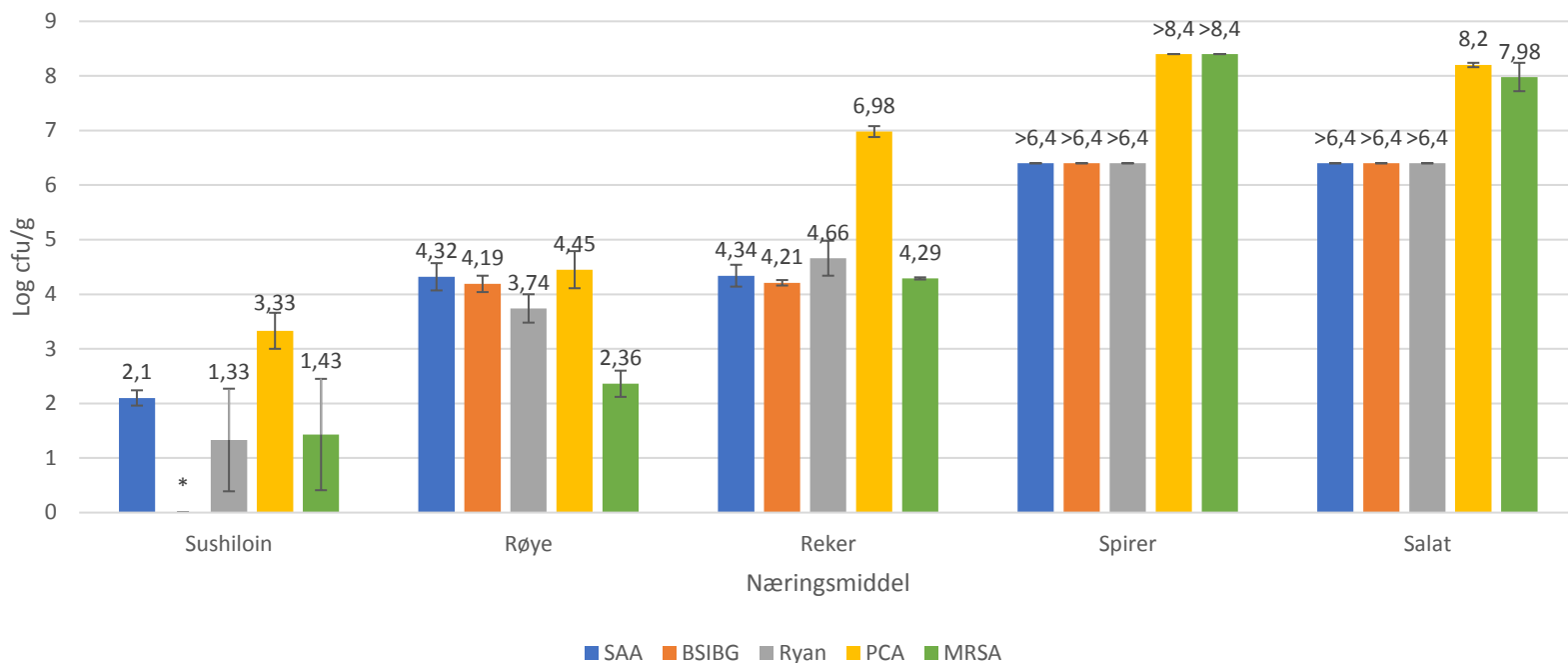
I dette forsøket ble dyrkingsmediernes evne til å isolere *Aeromonas* fra næringsmidler undersøkt. Resultatene fra næringsmiddelanalysene presenteres i figur 22 som viser gjennomsnittlig kimtall i næringsmidlene, analysert med de tre selektive mediene SAA, BSIBG og Ryan, samt PCA og MRSA for kvantifisering av totalt kimtall og melkesyrebakterier (log cfu/g). Resultatene for reker og sushiloin viser en høyere vekst på PCA med en forskjell på 2-2,5 logenheter sammenlignet med *Aeromonas*-mediene, samt en tilnærmet lik vekst på PCA og *Aeromonas*-mediene på røyeprøven. Det er generelt et lavere kimtall på sjømatprøvene enn de vegetabiliske prøvene, dette skyldes den overgrodde veksten på salat- og spireprøvene på de fleste fortynningene.

Med unntak av salatprøvene på PCA og MRSA, hadde alle spire- og salatprøvene over 250 kolonier på de høyest fortynnede prøvene. På grunn av dette ble det estimert et kimtall på større enn 6,4 log cfu/g ($\text{Log}(250/10^{-4})$) på *Aeromonas*-mediene. På MRSA og PCA ble det estimert et kimtall på større enn 8,4 log cfu/g ($\text{Log}(250/10^{-6})$).

Blant sjømatproduktene hadde sushiloin det laveste kimtallet på alle dyrkingsmediene, og ingen påvist vekst på BSIBG. Reke skiller seg ut på grunn av et høyere totalt aerobt kimtall.

Det ble utført en statistisk enveis variansanalyse for å utrede om det foreligger en forskjell i kimtall på de selektive dyrkingsmediene. Resultatet fra analysen viser at det ikke er en signifikant ($p > 0,05$) forskjell i kimtall mellom SAA, BSIBG og Ryan for sjømatproduktene.

Det ble kun funnet en signifikant forskjell i kimtall mellom SAA og BSIBG for sushiloinprøvene, der SAA er signifikant ($p < 0,05$) større enn BSIBG.



Figur 22: Gjennomsnittlig kimtall for de ulike næringsmiddelprøvene kvantifisert på SAA, BSIGA, Ryan agar, PCA og MRS agar (n=3 for hver gruppe). Næringsmiddelprøvene av spirer og salat var stort sett overgrodd, og på grunn av dette angis resultatene for disse som et minste estimat. *Det ble ikke påvist vekst på BSIBG fra sushiloinprøven

4.2.1 Identifisering og verifisering av plukkede kolonier

Totalt ble 52 ulike bakteriekolonier fra de tre selektive agarene plukket, både kolonier med typisk «*Aeromonas*-utseende», men også atypiske kolonier. Samtlige prøver ble rendyrket på TSA og gjennomgikk en oksidasetest. 14 kolonier var oksidasenegative, mens de resterende 38 koloniene var positive. Oversikt over positive og negative kolonier foreligger i vedlegg 2.

Etter at koloniens DNA ble isolert, ble det utført PCR og gelektroforese. Gelektroforesen med påfølgende visualisering av PCR-produktene bekreftet at det var amplifisert et produkt med størrelse på ca. 1000 basepar fra alle prøvene/koloniene, den negative kontrollen var negativ ved alle PCR-oppsett. Det henvises til vedlegg 3 for gelbilder.

Før DNA prøvene ble sendt til sekvensering ble DNA-konsentrasjonen i alle prøver målt. Den laveste verdien var prøve 33 med konsentrasjoner på 39,02 ng/μl, den høyeste var prøve 52 med konsentrasjon på 197,15 ng/μl. Kun prøver med en DNA-konsentrasjon på 30-80 ng/μl ble sendt

til sekvensering. Prøver med lavere konsentrasjon ble forkastet, mens prøver over 80 ng/μl ble fortynnet. DNA-konsentrasjoner for samtlige prøver oppgis i vedlegg 4.

4.2.2 Resultater fra sekvensering

Av totalt 52 DNA-prøver ble det mottatt 51 DNA-sekvenser. Resultatene fra sekvenseringen framkommer i tabellene 11, 12, 13, 14 og 15. Tabellene viser hvilket medium koloniene er plukket fra og hva som er den identifiserte bakterieslekten. I tillegg viser tabellene hvor mange prosent av sekvensen som stemmer overens med det beste treffet i NSBI nukleotid database BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Tabellene viser også prosentfordeling av bakterieslekter identifisert i forsøket.

Ingen av de presumptive *Aeromonas*-artene som hadde et typisk *Aeromonas*-utseende fra næringsmiddelanalysene ble identifisert som *Aeromonas*. Det var bakterieslekten *Pseudomonas* som tydelig dominerte i prøvene, spesielt i sjømatproduktene. Prøvene av spirer skilte seg ut på grunn av de identifiserte slektene var *Klebsiella* og *Enterobacter*.

På BSIBG ble det kun funnet bakterier fra slekten *Pseudomonas*. Mens på Ryan ble det påvist flest ulike bakterieslekter, disse var *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* og *Rahnella*. Tre av disse ble også funnet på SAA, *Klebsiella*, *Enterobacter* og *Pseudomonas*. Det henvises til vedlegg 2, der den fullstendige tabellen av alle prøver framkommer.

Resultatene fra sekvenseringen bidro også med forståelsen av differensieringsevnen til dyrkingsmediet Ryan (Figur 23). Den tydelig gulfargede kolonien ble identifisert som *Serratia* etter sekvensering. Kolonien ble funnet på prøve C fra sushiloin og er nummerert i henhold til tabellen i vedlegg 2.

Tabell 11: Prøver av reker. Av totalt 16 plukkede kolonier ble alle identifisert som *Pseudomonas*

Prøve	Antall kolonier	Medium	Identifisert bakterieslekt	Basepar lengde	% identitet
A	3	BSIBG	<i>Pseudomonas</i>	802-939	>98,40 %
B	3	BSIBG	<i>Pseudomonas</i>	797-939	>99,26 %
C	3	BSIBG	<i>Pseudomonas</i>	801-1038	>98,52 %
C	5	SAA	<i>Pseudomonas</i>	807-1009	>98,90 %
C	2	Ryan	<i>Pseudomonas</i>	1034-1063	>99,32 %

Prosentvis fordeling blant identifiserte kolonier

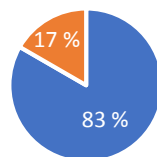


■ *Pseudomonas*

Tabell 12: Prøver av salat. Av totalt 6 kolonier ble de fleste identifisert som *Pseudomonas*

Prøve	Antall kolonier	Medium	Identifisert bakterieslekt	Basepar lengde	% identitet
A	2	BSIBG	<i>Pseudomonas</i>	798-799	>99,87 %
B	2	Ryan	<i>Pseudomonas</i>	275-1035	>99,64 %
B	1	Ryan	<i>Rahnella</i>	1035	99,61 %
B	1	SAA	<i>Pseudomonas</i>	775	99,61 %

Prosentvis fordeling blant identifiserte kolonier

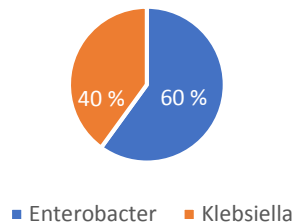


■ *Pseudomonas* ■ *Rahnella*

Tabell 13: Prøver av spirer. Av totalt 5 kolonier, ble det identifisert Klebsiella og Enterobacter

Prøve	Antall kolonier	Medium	Identifisert bakterieslekt	Basepar lengde	% identitet
A	1	Ryan	<i>Klebsiella</i>	1101	99,09 %
A	1	Ryan	<i>Enterobacter</i>	884	99,43 %
B	2	SAA	<i>Enterobacter</i>	981-1040	>99,49 %
C	1	SAA	<i>Klebsiella</i>	1037	99,61 %

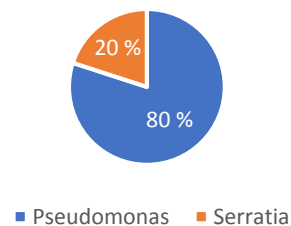
Prosentvis fordeling blant identifiserte kolonier



Tabell 14: Prøver av sushiloin. Av totalt 5 kolonier ble de fleste identifisert som Pseudomonas

Prøve	Antall kolonier	Medium	Identifisert bakterieslekt	Basepar lengde	% identitet
A	1	SAA	<i>Pseudomonas</i>	1055	99,53 %
C	1	Ryan	<i>Serratia</i>	774	99,35 %
C	1	Ryan	<i>Pseudomonas</i>	57	96,55 %
C	2	SAA	<i>Pseudomonas</i>	64-873	>99,77 %

Prosentvis fordeling blant identifiserte kolonier



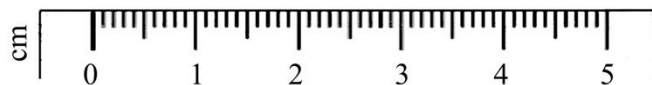
Tabell 15: Prøver av ishavsrøye. Av totalt 19 kolonier ble alle identifisert som *Pseudomonas*

Prøve	Antall kolonier	Medium	Identifisert bakterieslekt	Basepar lengde	% identitet
A	5	SAA	<i>Pseudomonas</i>	888-1022	>99,51 %
A	3	BSIBG	<i>Pseudomonas</i>	896-1039	>99,11 %
B	4	Ryan	<i>Pseudomonas</i>	870-1094	>99,23 %
B	3	SAA	<i>Pseudomonas</i>	951-1023	>99,22 %
B	3	BSIBG	<i>Pseudomonas</i>	549-995	>98,90 %
C	1	SAA	<i>Pseudomonas</i>	1019	99,80 %

Prosentvis fordeling blant identifiserte kolonier



■ *Pseudomonas*



Figur 23: Illustrerer differensieringsevnen til dyrkingsmediet Ryan. Bildet er tatt etter 48 timers inkubasjon

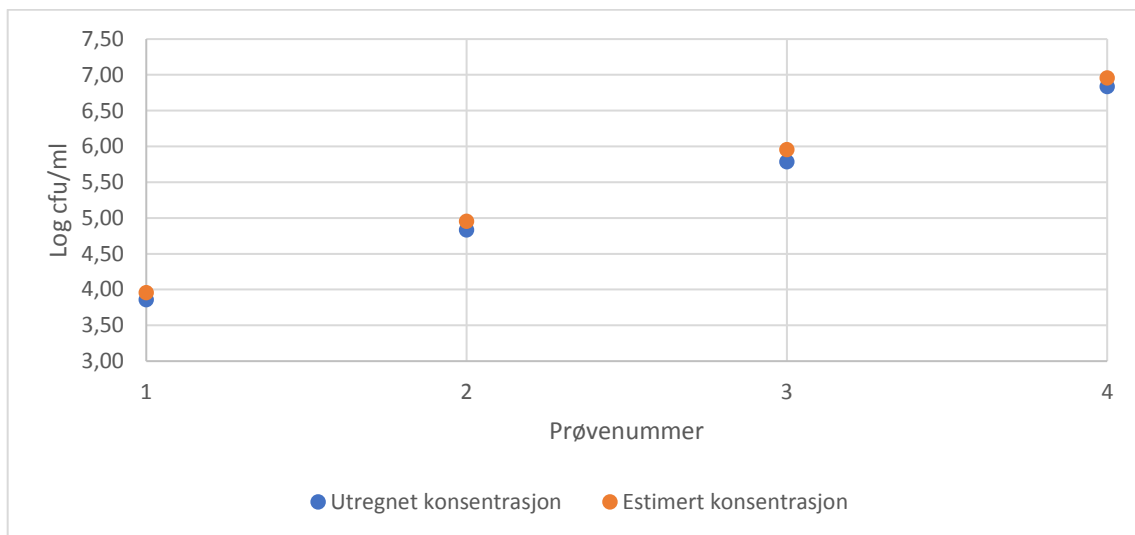
4.3 Kvantifisering av *Aeromonas* i kunstig kontaminerte lakseprøver

Målet med dette forsøket var å utrede medienes evne til å gjenfinne *Aeromonas* i kunstig kontaminerte lakseprøver med en økende tilsatt bakteriekonsentrasjon. I tillegg ble det tatt referanseprøver av laksen uten kontaminasjon for sammenligning.

4.3.1 Konsentrasjon av inokulum

Målet var å lage fire inokulum med stigende konsentrasjon fra 10^3 til 10^6 .

Ut fra verdiene vist i Figur 24 er det påvist en tydelig sammenheng mellom forhåndsestimatet av kimtallet til inokulumet og kimtallet som ble utregnet etter analysering. Fullstendig utregning er vist i vedlegg 5.



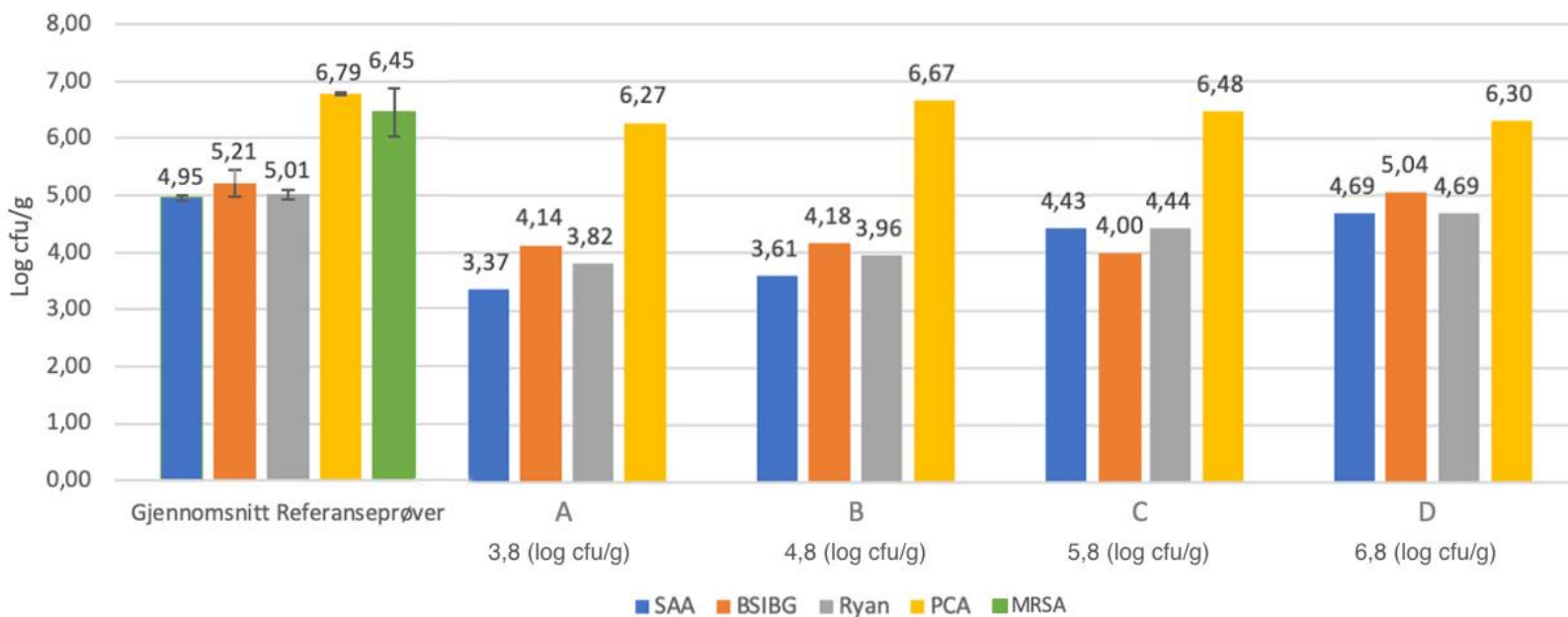
Figur 24: Estimert konsentrasjoner av inkolumet basert på OD-avesning (600 nm) omregnet til log cfu/ml og den utregnede verdien etter oppdyrking på TSA ved 30°C i 24 timer.

4.3.2 Gjennomsnittlig kimtall i referanseprøver av laks og kunstig kontaminerte lakseprøver med økende tilsatt bakteriekonsentrasjon

Resultatene viser en noe høyere vekst på *Aeromonas*-mediene [figur 25], sammenlignet med total mengde aerob vekst på PCA. Det viser også en stigende kurve av vekst av den totale bakteriefloraen fra prøve A til D. Noen variasjoner mellom de tre mediene, spesielt for prøve A og B. For alle prøver har den totale aerobe floraen blitt hemmet vesentlig ved bruk av *Aeromonas*-mediene. Under avlesning kunne det sees et mer entydig koloniutseende ved høyere tilsatt inokulums-konsentrasjoner.

Referanseprøven er gitt som gjennomsnitt av to paralleller, mens prøve A, B, C og D er enkle prøver uten paralleller. Prøve A er tilsatt inokulum med en konsentrasjon på 3,8 (log cfu/g), prøve B på 4,8 (log cfu/g), prøve C 5,8 (log cfu/g) og prøve D 6,8 (log cfu/g).

Den statistiske analysen (enveis ANOVA) viser at det ikke er en signifikant ($p > 0,05$) forskjell i kimtall mellom SAA, BSIBG og Ryan for referanseprøvene.



Figur 25: Resultat fra de ulike lakseprøvene på de ulike dyrkningsmediene, referanseprøver er gitt som gjennomsnitt av to paralleller ($n=2$). A, B, C og D ($n=1$) prøvene er tilsatt inokulum med henholdsvis en økning på 1 logverdi i bakteriekonsentrasjon.

4.3.3 Identifisering og verifisering av plukkede kolonier

Det ble valgt ut totalt 32 kolonier fra de ulike mediene, samtlige prøver ble rendyrket på TSA og gjennomgikk en oksidasetest. 4 kolonier var oksidasenegative, mens de resterende 28 koloniene var positive. Alle koloniene som var negative ble senere identifisert til å være ikke-*Aeromonas* arter. Oversikt over positive og negative kolonier foreligger i vedlegg 2.

Etter at koloniens DNA ble isolert, ble det utført PCR og gelektroforese, det henvises til vedlegg 3 for gelbilder. Resultatene fra gelektroforesen påviste PCR produkt i alle prøver, unntatt 2 der det ikke ble påvist bånd på gelbildene. Den negative kontrollen var negativ ved alle PCR-oppsett.

Før DNA prøvene ble sendt til sekvensering ble DNA-konsentrasjonen i alle prøver målt. De laveste verdiene var prøve 62 og 64 med konsentrasjoner på henholdsvis 22,11 ng/μl og 22,95 ng/μl, den høyeste var prøve 78 med konsentrasjon på 121,75 ng/μl. Kun prøver med en DNA-konsentrasjon på 30-80 ng/μl ble sendt til sekvensering. Prøver med lavere konsentrasjon ble forkastet, mens prøver over 80 ng/μl ble fortynnet. I dette tilfellet ble prøve 62 og 64 forkastet. DNA-konsentrasjoner for samtlige prøver oppgis i vedlegg 4.

4.3.4 Resultater fra sekvenseringen

Tabell 16 og 17 viser de 30 identifiserte koloniene fra lakseprøvene. I prøvene uten tilsatt inokulum ble ingen kolonier identifisert som *Aeromonas*. Mens de kunstig kontaminerte prøvene viste stor gjenfinningsgrad av *Aeromonas*, 15 av 23 ble identifisert som *Aeromonas*.

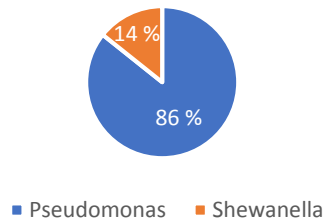
I dette forsøket ble det både plukket presumptive *Aeromonas*-arter som hadde et typisk *Aeromonas*-utseende, men også ikke-presumtive *Aeromonas* som tydelig skilte seg ut. På BSIBG og SAA ble henholdsvis 4 av 4 og 6 av 8 presumptive *Aeromonas* confirmert. Men på Ryan ble det confirmert flere *Aeromonas* enn presumptive *Aeromonas*, på grunn av en uvanlig koloni som skilte seg ut, men likevel viste seg å være *Aeromonas*.

På BSIBG ble det kun funnet ikke-*Aeromonas* arter fra slekten *Pseudomonas*. På Ryan ble det påvist flest ulike ikke-*Aeromonas* arter, disse var *Shewanella*, *Pseudomonas* og *Yersinia*. To av disse ble også funnet på SAA, *Yersinia* og *Pseudomonas*. Det henvises til vedlegg 2, der den fullstendige tabellen av alle prøver framkommer.

Tabell 16: Miljøprøver av laks uten tilsatt inokulum. Av totalt 7 kolonier ble 6 identifisert som *Pseudomonas*

Prøve	Antall kolonier	Medium	Identifisert bakterieslekt	Basepar lengde	% identitet
A	3	BSIBG	<i>Pseudomonas</i>	479-945	>99,15 %
A	1	SAA	<i>Pseudomonas</i>	862	99,77 %
B	2	BSIBG	<i>Pseudomonas</i>	909-946	>99,68 %
B	1	Ryan	<i>Shewanella</i>	1030	98,05 %

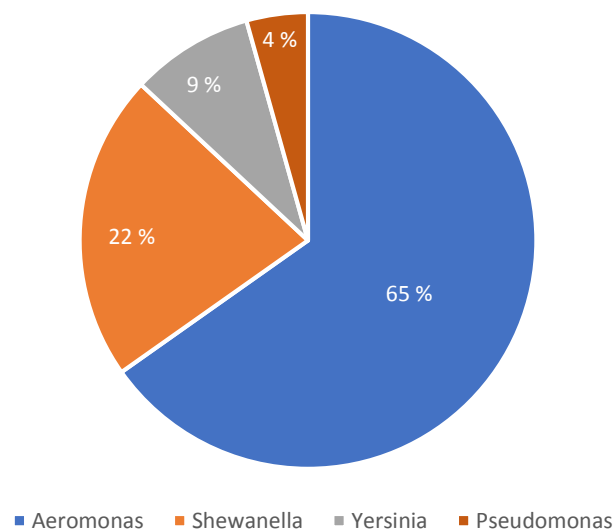
Prosentvis fordeling blant identifiserte kolonier



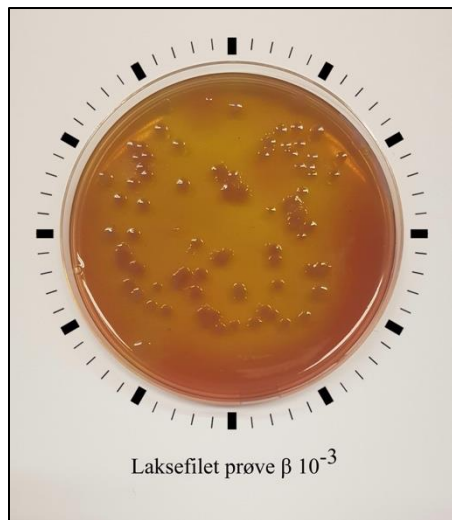
Tabell 17: Miljøprøver av laks med tilsatt inokulum. Av totalt 23 kolonier ble 15 identifisert som *Aeromonas*.

Prøve	Antall kolonier	Medium	Identifisert bakterieslekt	Basepar lengde	% identitet
A	3	Ryan	<i>Shewanella</i>	923-1077	>98,15 %
A	1	Ryan	<i>Yersinia</i>	1004	99,60 %
A	1	Ryan	<i>Aeromonas</i>	841	99,64 %
A	1	SAA	<i>Pseudomonas</i>	298	98,66 %
B	4	Ryan	<i>Aeromonas</i>	836-1110	>99,36 %
B	2	Ryan	<i>Shewanella</i>	962-1071	>98,13 %
B	3	SAA	<i>Aeromonas</i>	901-1039	>99,56 %
B	1	SAA	<i>Yersinia</i>	1104	99,82 %
C	3	SAA	<i>Aeromonas</i>	816-1017	>99,26 %
C	3	BSIBG	<i>Aeromonas</i>	883-1005	>98,87 %
D	1	BSIBG	<i>Aeromonas</i>	1020	99,71 %

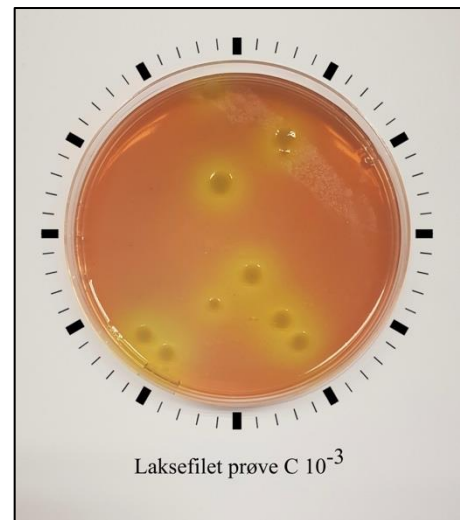
Prosentvis fordeling blant identifiserte kolonier



Forsøket ga også flere tydelige resultater angående differensiering mellom ulike kolonier på dyrkningsmediene. Figur 26 og 27 viser differensieringsevnen til dyrkningsmediet BSIBG etter 48 timers inkubasjon. Ut ifra disse eksemplene vil det være relativt enkelt å skille *Aeromonas* fra *Pseudomonas* når det kommer til koloniutseende. Flere av prøvene på BSIBG fra dette forsøket hadde lignende utseende som eksemplene, der det ble påvist lilla kolonier på referanseprøvene, og brune kolonier med en tydelig gul sone på de kunstig kontaminerte prøvene.

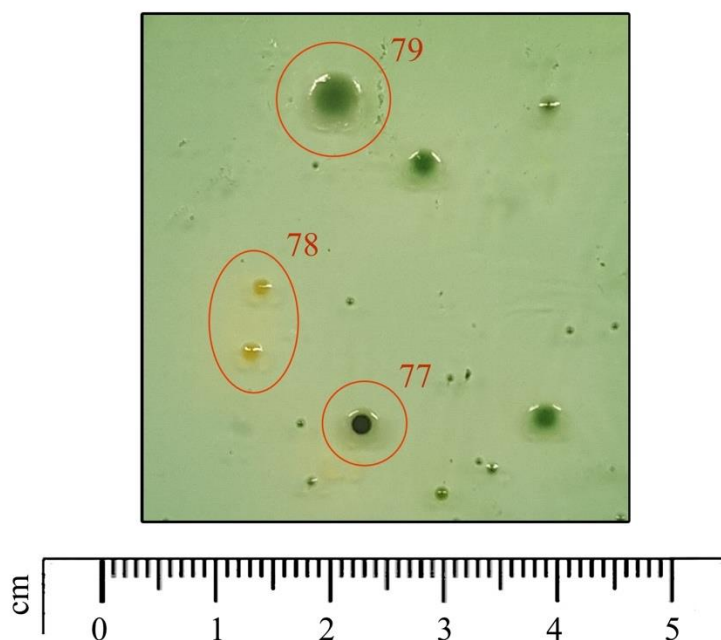


Figur 26: Eksempel på en av referanseprøvene fra forsøket. To kolonier fra denne skålen ble identifisert som Pseudomonas. Prøven viser samsvar med utseende til Pseudomonas fluorescens som danner lilla kolonier.



Figur 27: Eksempel på en av de kunstig kontaminerte prøvene fra forsøket. To kolonier ble identifisert som Aeromonas. Det framkommer en tydelig forskjell på koloniutseende fra bildet til venstre.

Det ble også påvist forskjeller i kolonietutseende på Ryan som vist i figur 28. Bildet i figuren stammer fra den kunstig kontaminerte lakseprøven A med fortykning 10^{-2} . Denne prøven viste seg å ha en mikroflora hvorav flere bakteriearter kunne vokse på Ryan. Den svarte kolonien nr. 77 ble identifisert som *Shewanella*, mens de gule koloniene nr. 78 ble identifisert som *Yersinia*. Den grønne kolonien nr. 79, med en lys glorie, er et typisk eksempel på utseende til *Aeromonas*-arter, dette ble bekreftet etter sekvensering. Koloniene er nummerert i henhold til tabellen i vedlegg 2.



Figur 28: Illustrerer differensieringsevnen til dyrkningsmediet Ryan. Bildet er tatt etter 48 timers inkubasjon.

5. Vurdering

I dette kapitlet framkommer vurderingen av oppgavens resultater fra de ulike forsøkene som ble gjennomført for å sammenligne de tre mediene SAA, BSIBG og Ryan agar

Den viktigste parameteren som danner grunnlaget for sammenligningen av de ulike dyrkningsmediene er selektivitet. Utgangspunktet for vurderingen av selektivitetsgraden til de ulike dyrkningsmediene er den kvalitative påvisningen av ulike ikke-*Aeromonas* arter på mediene. For videre sammenligning av de ulike dyrkningsmediene ble det vurdert faktorer som differensieringsevne, tillaging og inkubasjonstid.

5.1 Medietillagning

Ved tillaging av BSIBG ble det observert betydelige mengder små røde uoppløste partikler som førte til at agaren i skålene fikk et «grumsete» utseende. I tillegg ble det observert store mørkegrønne flekker med en diameter mellom 3,0-10,0 mm. Det spekuleres om denne feilen skyldes for lang eller kort koke- og tempereringstid, eller skyldes utløpsdatoen som var for nesten 3 år siden. I følge Produsenten (LABm, 2017a) er agaren definert som lilla og gjennomsiktig, dette samsvarer ikke med vår BSIBG som var rød / rødbrune som tyder på at de uoppløste partiklene har hatt en innvirkning på fargen, mediet og koloniene. På BSIBG vil bakterier med evne til å nedbryte xylose danne en gul sone rundt seg. I vårt forsøk fikk alle *Aeromonas*-artene en gul sone rundt koloniene, men ifølge andre studer Corry Janet et al. (2012, s. 461); J. Michael Janda and Abbott (2007, s. 60) nevnes det at *Aeromonas* ikke kan bryte ned xylose som tyder på denne gulfargen kommer av andre årsaker eller noen få arter av *Aeromonas* har evne til å bryte ned xylose.

Tillaging av BSIBG agaren ble gjentatt på grunn av de uoppløste partiklene. Tidsperioden for kokeprogrammet ble oppjustert fra 10 til 15 minutter, i tillegg ble tempereringstiden nedjustert. Endringene i tillagingsprosessen førte til et bedre sluttresultat, agaren var fortsatt noe grumsete, men langt bedre enn den første batchen.

SAA ble ansett som et klart og tydelig medium, men sammenlignet med de andre mediene er SAA et ikke-kommersielt tilgjengelig produkt som må tillages. SAA består av syv komponenter som må tilsettes og vil derfor ha større mulighet for feilkilder både under innveing og overføring

av komponentene. Dette kan igjen føre til at det oppstår variasjoner i medieinnholdet avhengig av produksjonstidspunkt og hvem som produserer det.

Ved tillaging av SAA var det visse variasjoner fra batch til batch, blant annet fargen.

Fargeforskjellen varierte mellom ulike nyanser av oransje, noen var lysoransje mens andre var mørkeoransje. Dette skyldes fargestoffet fenolrød som skal tilsettes i små konsentrasjoner (0,027 g/L). Dermed er det lett for at små unøyaktigheter skjer og fører til en fargeforskjell. Selv om det ble observert en fargeforskjell virker det som indikatoren fortsatt er egnet til å identifisere produksjon av syre- og basekomponenter.

Teksturen til SAA var noe myk i forhold til andre medier brukt i dette forsøket, og det førte til problematikk under utstrykning og plukking av kolonier. Problemet oppstod etter en endring i resepten, der Proteose pepton nr. 3 (Difco™) ble erstattet med Proteose pepton (Oxoid). Det spekuleres derfor om respetendringen førte til konsistensendringen i mediet.

Ampicillin tilsettes som selektiv komponent i både Ryan agar og SAA. SAA tilsettes 10 mg/L mens Ryan agar opprinnelig ble tilsatt 5 mg/L (i henhold til produsentens anbefalinger).

Konsentrasjonen av ampicillin i Ryan agar ble økt fra 5 til 10 mg/L for å forsøke å øke selektiviteten. Ved økt konsentrasjon av ampicillin ble det observert en mindre effekt enn antatt. Vekst av *Shewanella putrefaciens* ble inhibert ved tilsetning av 10 mg/L mens for *E. coli* ble det observert litt reduksjon i vekst. Det er fortsatt mulig å øke konsentrasjonen av ampicillin. I følge andre studier ble kun 17 % av *Aeromonas*-arter inhibert ved en konsentrasjon på 32 mg/L på mediet «Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth» (Huddleston et al., 2007, s. 1, 42). I tillegg testet andre studier 100 mg/L ampicillin på agaren «MacConkey Tween 80 ampicillin», men *Aeromonas* ble for kraftig inhibert til å være nyttefullt (Kelly, Stroh, & Jessop, 1988, s. 1738). Andre studier har vist at *A. trota* er den eneste *Aeromonas*-arten som er sensitiv for ampicillin uansett hvilken konsentrasjon som benyttes i mediet (Latif-Eugenín et al., 2016, s. 884).

En fordel med BSIBG er at det brukes andre komponenter enn ampicillin for selektivitet. Fravær av antibiotikum kan være til fordel for antibiotikumresistens-problematikken (World-Health-Organization, 2018). I tillegg vil det være et lettere medium å håndtere og et raskere medium å lage siden det er den eneste som ikke skal tilsettes komponenter etter varmebehandling.

Istedenfor ampicillin bruker BSIBG gallesalter for å inhibere gram-positive bakterier, ved høye konsentrasjoner inhiberes også noen gram-negative bakterier. I følge Want and Millership (1990)

som testet 7 typer gallesalter på 37 *Aeromonas*-stammer, viser det seg at alle var lik eller mindre inhibert enn *E. coli* (NCTC 1041). For inhibering av *Aeromonas* var det nødvendig å tilsette mellom 5-10 ganger mer gallesalt. En økning av gallesalter vil man kunne være aktuelt for å totalt-inhibere *E. coli*.

Ryan og BSIBG viser seg å være enklere å produsere og jobbe med sammenlignet med SAA.

5.2 Oppdyrking av kjente bakteriestammer

Alle de utvalgte *Aeromonas*-artene vokste på alle mediene (SAA, Ryan og BSIBG). Det ble ikke observert noen store forskjeller i mengde vekst, noe som indikerer at ingen av *Aeromonas*-artene som ble testet i dette forsøket ble inhibert på noen av dyrkningsmediene.

Resultatene viser at SAA var mest selektivt. Det ble påvist rikelig vekst av *E. coli* på Ryan agar og den ble betydelig inhibert på BSIBG, dermed kan det se ut som SAA har bedre selektivitet enn Ryan og BSIBG. Ryan viste også evne til å oppdyrke *S. putrefaciens* før økningen av ampicillin fra 5 til 10 mg/L, isolatet ble ikke påvist på noen av de andre dyrkningsmediene.

Siden Ryan inneholder lik mengde ampicillin som SAA og i tillegg inneholder selektive komponenter som gallesalter, var disse resultatene uforventet. Det spekuleres i om *E. coli* kan ha blitt inhibert på SAA siden bakterier i familien *Enterobacteriaceae* er amylasenegative (Neys, Notebaert, Uyttendaele, & Debevere, 2000). Som følge av dette kan det være at *E. coli* ikke vokser på SAA siden dyrkningsmediet inneholder stivelse i motsetning til Ryan som inneholder sukkeralkoholer og laktose. På grunnlag av dette kan det tenkes å være fordelaktig å øke mengden gallesalter i Ryan.

Pseudomonas aeruginosa, *P. fluorescens* og *Enterobacter* vokste på alle de tre selektive mediene. Ingen av mediene påviste vekst av *B. thermospacta* og *S. aureus*. Det kan antas at både *S. aureus* og *B. thermospacta* ikke vokste på mediene siden disse bakteriene er gram-positive (Götz, Bannerman, & Schleifer, 2006, s. 5) (Stackebrandt & Jones, 2006, s. 477). De gram-positive bakteriene ble inhibert av ulike selektive komponenter som finnes i noen av dyrkningsmediene, som ampicillin, brilliant green og gallesalter (Bakker et al., 1992, s. 458-460; Corry Janet et al., 2012).

På grunn av den manglende selektive evnen til samtlige *Aeromonas*-mediene vil det være en fordel å kunne lett skille mellom *Aeromonas*- og ikke-*Aeromonas*- kolonier. Ved at de får ulikt utseende på koloniene vil det være lettere å kunne skille de fra hverandre.

Det var generelt visuelt vanskelig å skille *Aeromonas*-kolonier og ikke-*Aeromonas* kolonier fra hverandre. Men det kunne ses en forskjell mellom pseudomonadene og aeromonadene dyrket på BSIBG, da *P. fluorescens* dannet tydelig lilla kolonier. Samt antydning til lilla farge ved oppdyrking av *P. aeruginosa*, men grunnet veldig utflytende kolonier var det ikke like tydelig. Dette samsvarer ikke med produsentens beskrivelse. Både *Aeromonas* og *Pseudomonas* på BSIBG er beskrevet av produsenten (LABm, 2017a) som konvekse, glinsende, gjennomsiktig lysegrønne kolonier. De store forskjellene mellom vår og produsentens beskrivelse kan skyldes de røde og grønne uoppløste partiklene i agaren.

Neyts et al. (2000) viser til muligheten for å anvende en modifisert versjon av BSIBG, også kjent som m-BSIBG. pH i mediet ble under deres forsøk hevet til 8,7. Mengden gallsalter ble redusert og xylose ble erstattet med stivelse. *Aeromonas*-arter kan bryte ned stivelse til dekstrin ved hjelp av enzymet amylase. *Aeromonas* vil derfor kunne differensieres ved hjelp av fargekontraster. Aeromonader vil fremstå som lilla kolonier der amylase-negative bakterier vil fremstå som hvite til grønne kolonier.

Det ble observert noen visuelle forskjeller innad *Aeromonas*-artene dyrket på SAA. Noen arter sørget for at mediet fikk et tydelig fargeomslag fra oransje til rosa som skyldes endring i pH-indikatoren fenolrød ved pH-økning i mediet, mens andre arter ga et fargeomslag fra oransje til gul som følge av en pH-reduksjon i mediet. Forskjellen mellom pseudomonadene og aeromonadene dyrket på SAA var ikke like tydelig, alle pseudomonadene og noen av *Aeromonas*-arter dannet en rød sone, mens noen av *Aeromonas*-artene dannet en gul sone rundt koloniene. De gule koloniene samsvarer med NMKL sin beskrivelse av *Aeromonas*-kolonier, en såkalt gul / honninggul farge (Nordic-Committee-on-Food-Analysis, 2004). Av ikke-*Aeromonas* arter dannet også *Enterobacter* en gul sone rundt seg.

Aeromonas på Ryan agar dannet mørkegrønne ugjennomsiktige kolonier som er helt lik produsentens beskrivelse (Oxoid, 2019). *E. coli* dyrket på Ryan agar var lett å skille seg ut fra typiske *Aeromonas*-kolonier. *E. coli* dannet lyse kolonier med en antydning til gul sone rundt seg og skilte seg også ut på BSIBG med dannelse av lyselilla kolonier.

Under gjennomførelsen av dette forsøket og forsøket «oppdyrking av kjente isolater» oppstod det enkelte avvik som i større eller mindre grad kan ha påvirket resultatene. Hovedproblemet var at flere av agarskålene var fuktige etter kjølelagring som antagelig kan være grunnen til de bakteriekoloniene som fløt utover overflaten på BSIBG og Ryan. Dette gjorde det vanskelig å beskrive utseende til enkeltkolonier. I etterfølgende forsøk ble flere av agarskålene tørket i 30 minutter på 37°C i et inkubasjonsskap.

Helhetlig vurderes Ryan som dyrkningsmediet med lavest selektivitet basert på det gjennomførte forsøket og sammenlignet med de andre mediene. Når det gjelder BSIBG og SAA er det kun påvist små forskjeller i selektivitet.

5.3 Sammenligning av medienes evne til å isolere *Aeromonas* fra en blandet mikroflora

Bakgrunnen for dette forsøket var å undersøke medienes evne til å påvise og kvantifisere *Aeromonas* fra næringsmidler med en blandet mikroflora. Studier har vist at det kan være utfordrende å gjennomføre dette med dyrkningsmedier som ikke er fullstendig selektive, spesielt dersom bakgrunnsfloraen er flere ganger høyere enn mengden *Aeromonas* i prøven. (Fricker & Tompsett, 1989; Villari et al., 1999)

Næringsmidlene som ble valgt ut for å forsøke å detektere *Aeromonas*, ble valgt i henhold til der man kan forvente å finne *Aeromonas*. Tidligere har det blitt isolert *Aeromonas* fra laks (González-Rodríguez, Sanz, Santos, Otero, & García-López, 2002), reker (Hänninen, Oivanen, & Hirvelä-Koski, 1997), salat (Xanthopoulos, Tzanetakis, & Litopoulou-Tzanetaki, 2010) og spirer (Callister & Agger, 1987; Nagar, Shashidhar, & Bandekar, 2012).

Næringsmiddelprøvene av spirer og salat var stort sett overgrodd ved alle fortyninger, på grunn av dette er det eksakte kimtallet ukjent. Det foreligger dermed ingen tydelige data i henhold til forskjeller mellom mediene eller deres evne til å inhibere bakgrunnsfloraen hos salat og spirer. De dårlige resultatene for disse næringsmidlene skyldes først og fremst at prøvene ikke ble fortynnet nok. Det uventet høye kimtallet kan skyldes at næringsmiddelprøvene var nær utgått holdbarhet.

Helhetlig viser resultatene lavere kimtall på de selektive mediene enn på PCA, dette bekrefter at både SAA, Ryan og BSIBG viser en inhiberende effekt på den totale mikrofloraen. Resultatene

viser også at det er melkesyrebakterier tilstedeværende i alle prøver, disse hadde et generelt lavere kimtall enn den aerobe mikrofloraen. For sjømatproduktene er kimtallet for melkesyrebakterier omtrent 2 logenheter lavere enn kimtallet for den totale aerobe floraen. For prøvene av ishavsroyen er kimtallet på MRSA også betydelig lavere enn på de selektive mediene. Det vurderes om det kunne vært en fordel å inkubere *Aeromonas*-mediene anaerobt, siden det tyder på at en større andel av bakgrunnsfloraen kunne blitt hemmet. Men for å få et tydeligere inntrykk av den totale anaerobe mikrofloraen burde PCA ha blitt inkubert anaerobt.

Det var ingen signifikante ($p > 0,05$) forskjeller i kimtall mellom de ulike selektive dyrkningsmediene. Den eneste påviste statistiske forskjellen var for sushiloinprøven, der kimtallet for SAA var signifikant ($p < 0,05$) større enn BSIBG. Men kimtallet for SAA er basert på telling av 1-2 kolonier på 10^{-2} fortykning, dermed vurderes dette som et meget usikkert resultat og må tolkes med forsiktighet.

På grunnlag av dette vurderes det at mediene er like gode til å kvantifisere bakterier fra sjømatprodukter, og forskjellene ligger først og fremst i differensiering mellom ulike type kolonier.

På spire- og saltprøvene var det vanskelig å vurdere koloniutseende på samtlige medier, samt observere forskjeller på ulike kolonier, på grunn av overveksten. Kolonier fra reker, ishavsroye og sushiloin så like ut på SAA og hadde et typisk *Aeromonas*-utseende. Også på Ryan var bakteriekoloniene på næringsmiddelprøvene vanskelig å skille fra hverandre og var visuelt like *Aeromonas*-kolonier. Men det var ett unntak, én koloni i den ene parallellen (prøve c) på Ryan var tydelig gulfarget. Denne kolonien ble senere identifisert som *Serratia*. Dette eksemplet viser at Ryan har en form for differensieringsevne, selv om tidligere forsøk viste at mange bakterieslekter var visuelt like på Ryan.

På BSIBG viste samtlige kolonier fra dette forsøket et generelt mønster på dannelse av en lillafarge og de skilte seg tydelig ut fra det tidligere dokumenterte utseende til *Aeromonas* på BSIBG. Visuelt liknet mange av koloniene på utseende til *Pseudomonas fluorescens*, som ble observert ved utstrykning av kjente bakteriesterammer. På grunn av dette vurderes BSIBG til å ha en generelt god differensieringsevne, sammenlignet med de andre mediene.

Agarsksålene ble visuelt analysert både etter 24- og 48 timers inkubasjon for å kunne påvise en eventuell utvikling av veksten og utseende til koloniene. Både SAA og Ryan ga tydelig avlesbare

resultater etter 24 timer. Den observerte utviklingen fra 24 timers inkubasjon til 48 timer på Ryan og SAA var hovedsakelig knyttet til en størrelsesøkning av kolonier. Men på SAA var det også observert en utvikling av en rød eller gul sone rundt koloniene. Disse faktorene vurderes likevel til å være ubetydelige for avlesningen og differensieringen.

Når det gjelder BSIBG, ble det påvist antydninger til at mediets differensierende effekt ble tydeligere etter 48 timer, sammenlignet med 24 timers inkubasjon. Dette skyldes at lillafargen til *Pseudomonas*-kolonier var lite framtrædende etter 24 timers inkubasjon, men ble tydeligere etter 48 timer. I tillegg ble det observert en tydelig utvikling av en gul sone rundt typiske *Aeromonas*-kolonier, som var mer tydelig etter 48 timer.

Antydningene til en tydeligere og mer optimal avlesning av BSIBG etter 48 timer, kan skyldes at mediet ble inkubert på 30°C. I henhold til produsenten av dette dyrkingsmediet, oppgis en anbefalt inkubasjonstemperatur på 37°C (LABm, 2017a).

Resultatene fra sekvensering viser at *Aeromonas* ikke ble identifisert i noen av prøvene, det var et relativt uventet resultat siden det ble plukket et stort utvalg av kolonier med typisk *Aeromonas*-utseende. Sannsynligvis var *Aeromonas* ikke tilstedeværende i noen av næringsmidlene. Men siden det totale kimtallet var relativt høyt i flere av produktene (mellom 7 og >8.4 log cfu/g i reker, salat og spirer) kan det likevel tenkes at lave konsentrasjoner av *Aeromonas* i produktene ikke har blitt detektert.

En annen begrensning er antall kolonier som ble plukket fra hver skål, det spekuleres om det kunne ha vært en fordel å plukke en standardisert og randomisert mengde kolonier. Dette kunne ha gitt et bedre grunnlag for å estimere andelen bakterieslekter i prøvene. Det er også mulig at kolonier av *Aeromonas* har blitt oversett ved at de ikke har blitt plukket.

Både for ishavsrøye- og rekeprøvene ble samtlige kolonier identifisert som *Pseudomonas*. Salat- og sushiloiprøvene var også hovedsakelig dominert av *Pseudomonas*, der kun et par kolonier var andre arter. Prøvene av spirene var de eneste som tydelig skilte seg ut, siden det kun ble identifisert bakterier i familien *Enterobacteriaceae*, både *Enterobacter* og *Klebsiella*. Det er ikke uvanlig at bakterier fra denne familien dominerer ikke-behandlede spirer i henhold til en studie fra Abadias, Usall, Anguera, Solsona, and Viñas (2008) som fant et gjennomsnittlig kimtall på 7,2 (log cfu/g) *Enterobacteriaceae* i spirer.

På dyrkningsmediet Ryan ble det identifisert totalt fem ulike ikke-*Aeromonas* arter, disse var *Serratia*, *Rahnella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, og *Pseudomonas*. Siden alle fire førstnevnte bakterieslekter er i familien *Enterobacteriaceae*, antydes det at Ryan viser dårlig selektivitet for nettopp denne bakteriefamilien. Når det gjelder SAA ble det identifisert tre ulike ikke-*Aeromonas* arter. Mens det ble kun påvist vekst av *Pseudomonas* på BSIBG, men det er også verdt å nevne at det ikke ble valgt noen kolonier på BSIBG fra spireprøvene, der det ble funnet *Enterobacter* og *Klebsiella* på de andre mediene. Kun vekst av *Pseudomonas* på BSIBG stemmer godt overens med det observerte koloniutseende ved avlesning, som hovedsakelig var lillafargede kolonier. Disse resultatene stemmer dog ikke overens med andre funn. I henhold til produsenten skal ikke-*Aeromonas* arter, inkludert *Pseudomonas*, bli svakt grønne på BSIBG (LABm, 2017a).

Helhetlig ble det funnet antydninger på at BSIBG viser bedre selektivitet sammenlignet med de andre mediene, likevel kan det ikke sies med sikkerhet. Det vurderes om dette dyrkningsmediet også har en fordel når det kommer til differensieringsevne sammenlignet med Ryan og SAA. Det kan være spesielt fordelaktig å bruke BSIBG ved isolering av *Aeromonas* når det forventes at bakgrunnsfloraen som er dominert av *Pseudomonas*. Et eksempel på dette er sjømat der bakterier innad *Pseudomonas*-slekten ofte forekommer og regnes som primære forringelsesbakterier. (Feldhusen, 2000; Løvdal, 2015)

5.4 Kvantifisering av *Aeromonas* i kunstig kontaminerte lakseprøver

Hensikten med forsøket var å kunne se medienes evne til å påvise *Aeromonas* i prøver der forekomsten av ulike *Aeromonas*-arter kunne garanteres. Det var også av interesse å se medienes evne til å kvantifisere bakterien i ulike konsentrasjoner og sammenligne deres evne til å differensiere andre arter fra *Aeromonas*.

Valg av oppdyrkede arter i inokulumet ble gjort på grunnlag av differansen i koloniutseende som ble vist ved oppdyrking av isolater. Det ble valgt to arter *A. hydrophila* og *A. salmonicida* som begge dannet rød sone på SAA og *A. caviae* som danner en gulfarge i agaren. Hoel, Vadstein, and Jakobsen (2018) viser til at det også forekommer *A. salmonicida* som mesofile arter, slik som det er brukt i dette forsøket. Med en blandet flora av mesofile arter isolert fra næringsmidler kunne det anses at alle disse kunne vokse og bli identifisert senere i forsøket med de gitte vekstbetingelsene.

Å dyrke opp en kultur av *Aeromonas* til en gitt konsentrasjon kan være noe utfordrende. Det var ønsket å oppnå fire konsentrasjoner med en økende forskjell på ca. 1 logenhet. Resultatene viser hvor nært konsentrasjonen var med den estimerte konsentrasjonen og gir derfor et tydelig resultat på oppdyrkingen og fortynningen var vellykket.

Statistiske resultater fra enveis ANOVA utført på referanseprøvene viser ikke noen signifikante ($p > 0,05$) forskjeller i mengde vekst på de selektive mediene.

Det er ikke mulig å fastslå noen signifikante forskjeller i henhold til medienes evne til å gjenfinne *Aeromonas* i en prøve med relativt høyt totalkim (ca 7 log cfu/g) da det kun er analysert en prøve fra hver betingelse. Men resultatene som er vist indikerer ingen tydelige forskjeller.

På grunn av den tydelige økningen på 1 logenhet i inokulumkonsentrasjonene var det forventet en nokså stabil økning ved tilsetting av en bakteriesuspensjon i økende konsentrasjon, både ved total vekst av aerobe bakterier på PCA og total vekst på *Aeromonas*-mediene. Det vises heller ikke her en proporsjonal økning med tilsatt inokulum. Inokulumet ble tilsatt direkte på de snittede laksebitene er det en fare for at noe av væsken ikke har blitt med under homogenisering, men det anses som lite sannsynlig.

Neyts et al. (2000) viser også små variasjoner i log-verdi gjenfunnet *Aeromonas* ved tilsetning av inokulum med lignende konsentrasjoner som brukt i dette forsøket. Men i deres forsøk kunne det sees en tydeligere sammenheng mellom tilsatt inokulum og mengde *Aeromonas* gjenfunnet.

Det som er verdt å notere er forskjellene mellom kimtallene for PCA og *Aeromonas*-mediene. Dette indikerer også her som i det tidligere forsøket at den totale mikrofloraen har blitt hemmet til en grad og at kulturen på SAA, BSIBG og Ryan har et mindre bakterielt mangfold. Det kan tenkes at det i fravær av *Aeromonas* gir bedre forhold for andre bakterier å vokse opp på selektive medier. Dette kan forklare hvorfor referanseprøvene viser mer vekst enn de kunstig kontaminerte prøvene.

Det ble ikke påvist *Aeromonas* i referanseprøvene, og ut fra resultatene fra sekvenseringen tyder det på at *Aeromonas*-mediene hadde en dominant flora av *Pseudomonas*. Det ble påvist *Aeromonas* i laksefileten tilsatt inokulum, og dette ved alle tilsatte konsentrasjoner. Ut fra resultatene kan det tyde på at det er en høyere prosentandel *Aeromonas* ved høyere tilsatt konsentrasjon. Dette reflektere også den visuelle analysen av mediene da for eksempel prøve A tilsatt inokulumskonsentrasjon på ca 10^3 viste et bredere spekter ulike kolonier i motsetning til prøve C tilsatt ca 10^5 cfu/ml. Det vises også tydelige forskjeller i koloniutseende mellom referanseprøve og denne prøven (Figur 26 og 27), og indikerer at slike blanke, gule kolonier kan indikere presumptive *Aeromonas* i motsetning til mørke lilla kolonier ved oppdyrking på BSIBG.

Ut fra forsøket kan det ikke ansees noen spesifikk deteksjonsgrenser for hvor mye *Aeromonas* som må være til stede for å kunne gjenfinne dem. Men forsøket beviser at *Aeromonas* kan påvises i alle de tre mediene med den gitte metoden.

Ryan viser igjen en noe dårligere selektivitet sammenlignet med de to andre *Aeromonas*-mediene da det både ble identifisert *Shewanella* og *Yersinia* under dette forsøket. I henhold til identifisert *Shewanella* har majoriteten av disse koloniene blitt vist til å ha et svart utseende. Vogel, Venkateswaran, Satomi, and Gram (2005) viser til *Shewanella* sin evne til å produsere H_2S fra en rekke organiske og ikke-organiske kilder. H_2S produserende bakterier vil danne svarte kolonier på jern agar (Odeyemi, Burke, Bolch, & Stanley, 2018). Det kan derfor tenkes at det er en sammenheng mellom dette og de viste resultatene da Ryan inneholder jern i form av «Ammonium ferric citrate».

Totalt ble det indentifisert tre ulike ikke-*Aeromonas* arter i forsøket. En av disse var *Shewanella*, dette påviser at arter innad denne slekten fortsatt kan vokse etter økningen av ampicillin i Ryan. En forklaring på dette er at stammer innad arten *Shewanella putrefaciens* er relativt sensitive for ampicillin. En studie av Vogel, Jørgensen, Christensen, Olsen, and Gram (1997) viser at kun 13 av 52 testede stammer var resistente mot ampicillin.

Det ble identifisert to ulike ikke-*Aeromonas* arter på SAA, mens det bare ble identifisert *Pseudomonas* på BSIBG. *Yersinia* ble også vist til å få en kraftig gul farge på Ryan mens den får et lignende koloniutseende som *Aeromonas* ved påvisning på SAA. Både *Shewanella* og *Yersinia* er derfor enkle å skille fra *Aeromonas* og *Pseudomonas* ved oppdyrking på Ryan.

Alle påviste *Aeromonas* viser et generelt mønster innad dyrkningsmediene, der den danner grønne kolonier med blank glorie på Ryan, hvite/gule blanke kolonier på SAA og store gule kolonier på BSIBG. Et avvikende resultat fra dette er prøve 56. Som vist i vedlegg 2 samsvarte utseende på denne kolonien med alle andre identifiserte *Shewanella*. Det er mulig at dette kan være på grunn av en kontaminasjon, enten under plukkingen eller isolering.

Alle identifiserte *Aeromonas*-artene viste lignende koloniutseende og flere av pseudomonadene fikk et mørkt og/eller en lilla farge ved oppdyrking på BSIBG. Noe differensiering kan derfor være mulig mellom disse to artene. Da *Pseudomonas* har vist seg å være det største problemet ved påvisning av *Aeromonas*, kan muligens lilla kolonier oversees ved plukking og konfirmering av presumptive *Aeromonas*.

Det ble ikke påvist en konsekvent differensieringevne mellom *Aeromonas* og ikke-*Aeromonas* arter på SAA. Mediet viste forskjeller innad *Aeromonas*-artene i henhold til de observerte fargedifferansene, *Aeromonas* kan derfor ikke differensieres fra andre bakterieslekter i henhold til farge.

Det ble ikke påvist vekst av noen gram-positive bakteriearter på noen av mediene under forsøket, alle de påviste ikke-*Aeromonas* artene var gram-negative. Dette viser at samtlige medier har gode egenskaper for å inhibere gram-positive bakterier. En av de største utfordringene knyttet til selektivitet for samtlige medier ser ut til å være *Pseudomonas*. Arter fra denne slekten har blitt påvist på alle de selektive mediene gjennom de ulike forsøkene.

5.5 Molekylærbiologiske og biokjemiske verifiseringstester

Etter isolering av DNA og utført PCR ble det påvist bånd ved gelelektroforese, i alle prøver med unntak av prøve 62 og 64. At det ikke ble påvist PCR-produkt ved gelelektroforese støttes ved den oppmålte lave konsentrasjonen av rensede PCR-produkter skiller seg betydelig ut fra resten av prøvene, disse prøvene hadde konsentrasjoner på henholdsvis 22,11 ng/ μ l og 22,95 ng/ μ l. Dette indikerer at det ble isolert mindre arvemateriale under isoleringstrinnet, andre feil kan også resultere i disse avvikene. Ellers har det blitt dannet tydelige bånd på alle prøver men det kan ikke ses noen sammenheng mellom målt konsentrasjon av PCR produkt og intensivitet på båndene vist ved gelelektroforese for positive prøver. Konsentrasjonsvariasjoner innad PCR-produktene vises i vedlegg 4

Bruk av 16s rRNA ved utført PCR har vist seg å fungere godt til å identifisere bakterier på slektsnivå, av totalt 82 innsendte prøver var det kun en prøve som ikke kunne identifiseres. Noen usikkerheter er knyttet til identifisering på artsnivå da det ved flere tilfeller under sammenligning med databasen BLAST ble oppgitt flere ulike arter. J. Michael Janda and Abbott (2007) henviser også til at identifisering av bakterier på artsnivå ved bruk av 16S rRNA ofte blir omtalt som «lav sannsynlighet» eller «akseptabel» identifisering.

I sammenheng med de ulike forsøkene ble det også utført en biokjemisk verifisering, nærmere sagt en oksidasetest. Formålet med oksidasetesten var å teste presumptive *Aeromonas*-kolonier, som skal være oksidasepositive, og unngå å telle eller utføre flere verifikasjonstester av disse dersom testen viser et negativt resultat. I teorien skal det dermed være relativt enkelt å for eksempel skille ut bakterier i familien *Enterobacteriaceae*, som er oksidasenegative (Tofteland & Ui, 2015, s. 10), dersom disse ikke har blitt inhibert.

Av totalt 81 utvalgte kolonier var 63 oksidasepositive mens 18 testet negativt for oksidase. 8 av de 18 koloniene som testet negativt ble senere identifisert som bakterier i familien *Enterobacteriaceae*, disse var *Klebsiella*, *Enterobacter* og *Serratia*, *Yersinia*. I tillegg testet en koloni av *Shewanella*, negativt som dette stemmer overens med teorien (Sharma & Kalawat, 2010). De gjenstående 9 negative oksidasetestene var fra *Pseudomonas*, som i teorien skal være oksidasepositive (Dogan & Boor, 2003). Hva som kan ha ført til dette avviket er uklart.

Etter gjennomførelse av oksidasetesten av samtlige utvalgte kolonier, ble oksidasenegative kolonier likevel tatt med videre til PCR, gelelektroforese og sekvensering. Dette ble gjort for å

kunne vurdere om oksidasetesten faktisk er en effektiv metode for å skille ut ikke-*Aeromonas* arter.

Det var også to eksempler på positive tester som i teorien skulle vært negativ. Dette var *Yersinia* som skal ifølge Percival and Williams (2013b, s. 249) være oksidasenegativ, og *Shewanella*. Det noteres at ifølge pakningsvedlegget til BD BBL DrySlide skal oksidase positive tester vise blå farge innen 20 sekunder, men det ble observert at noen prøver viste positivt resultat mye tidligere enn andre. Det indikeres da at *Yersinia* og *Shewanella* har blitt feilaktig vurdert som oksidasepositiv i dette forsøket og dette resultatet oversees i denne sammenhengen.

Helhetlig viser resultatene at *Enterobacteriaceae* faktisk kan ekskluderes fra presumptive *Aeromonas* ved hjelp av oksidasetesten. Det er imidlertid ett stort problem med oksidasetesten som er knyttet til bakterieslekten *Pseudomonas*. Disse er i lik linje med *Aeromonas* oksidasepositive, det betyr at dersom *Pseudomonas* ser like ut som *Aeromonas* på dyrkningsmediene, kan man ikke bruke oksidasetest til å skille dem ut.

6. Konklusjon

I sammenheng med denne bacheloroppgaven har det blitt dokumentert at samtlige *Aeromonas*-medier, SAA, BSIBG og Ryan hadde gode vekstvilkår for oppdyrking av *Aeromonas*-isolater. Alle de selektive mediene viste evne til å inhibere en del av bakgrunnsfloraen i ulike næringsmidler. Det har også blitt påvist at mediene fungerer til å gjenfinne *Aeromonas* i en blandet mikroflora, men at deteksjonsgrenser må testes ytterligere. I alle forsøkene har det kun blitt identifisert gram-negative bakterier, som antyder at alle gram-positive bakterier ble inhibert av de selektive mediene.

I forsøkene som ble gjennomført i denne oppgaven ble det hovedsakelig vurdert faktorer knyttet til medienes selektivitet, differensieringsevne og tillaging. På grunnlag av de gjennomførte forsøkene konkluderes det med at dyrkingsmediet Ryan har vist antydninger til en lavere selektivitet sammenlignet med SAA og BSIBG. Basert på denne faktoren regnes dette mediet som mindre optimalt for påvisning av *Aeromonas*.

Det har ikke blitt funnet betydelige forskjeller i selektivitet mellom SAA og BSIBG. Men på grunn av BSIBG sin evne til å differensiere enkelte *Pseudomonas*-arter med et koloniutseende som skiller seg fra *Aeromonas*, og i tillegg til at mediet er svært enkelt å tillage, kan det være et bedre alternativ enn SAA.

7. Forslag til videre arbeid

Til videre arbeid kan det være verdt å teste ut flere dyrkningsmedier enn det som har blitt gjort i denne oppgaven for å se etter bedre alternativer for påvisning av *Aeromonas*.

I denne oppgaven har det blitt vist at ampicillin-konsentrasjonene brukt i forsøkene er noe lavere enn den teoretiske toleransen til *Aeromonas*, videre kan forsøk gjøres ved å øke konsentrasjonen for både SAA og Ryan. Det kan i tillegg være muligheter for å teste disse dyrkningsmediene med anaerob inkubering for å se om det bidrar til bedre selektivitet og mindre påvisningsproblemer der *Pseudomonas* er tilstede.

Videre testing av BSIBG er nødvendig for å konstatere differensieringsevnen mellom *Pseudomonas* og *Aeromonas*. Det kan også være hensiktsmessig å gjennomføre forsøk med en modifisert versjon av BSIBG.

Da denne oppgaven ikke kunne fastslå en spesifikk deteksjonsgrense for påvisning av *Aeromonas* på SAA, BSIBG og Ryan, foreslås det videre forskning som kan utrede det.

8. Referanseliste

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., & Viñas, I. (2008). Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *International Journal of Food Microbiology*, 123(1-2), 121-129.
- Acumedia. (2017a). Beef extract powder (7228). Retrieved from https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7228_pi.pdf
- Acumedia. (2017b). Yeast extract (7184). Retrieved from https://foodsafety.neogen.com/pdf/acumedia_pi/7184_pi.pdf
- Aryal, S. (2018). Oxidase Test- Principle, Uses, Procedure, Types, Result Interpretation, Examples and Limitations. Retrieved from <https://microbiologyinfo.com/oxidase-test-principle-uses-procedure-types-result-interpretation-examples-and-limitations/>
- Awan, F., Dong, Y., Wang, N., Liu, J., Ma, K., & Liu, Y. (2018). The fight for invincibility: environmental stress response mechanisms and *Aeromonas hydrophila*. *Microbial pathogenesis*, 116, 135-145.
- Bakker, P., Van Doorne, H., Gooskens, V., & Wieringa, N. F. (1992). Activity of gentian violet and brilliant green against some microorganisms associated with skin infections. *International Journal of Dermatology*, 31(3), 210-213. doi:10.1111/j.1365-4362.1992.tb03939.x
- BOOSTER. (u.å.). General PCR protocol. Retrieved from <https://www.bosterbio.com/protocol-and-troubleshooting/molecular-biology-protocol-pcr>
- Callister, S. M., & Agger, W. A. (1987). Enumeration and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas caviae* isolated from grocery store produce. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53(2), 249-253.
- Corry Janet, E. L., Curtis Gordon, D. W., & Baird Rosamund, M. (2012). *Culture Media for the Isolation of Aeromonas spp. and Plesiomonas shigelloides* (3rd Edition ed.): Royal Society of Chemistry.
- Corry, J. E. L., Curtis, G. D. W. a., & Baird, R. M. a. (2011). *Handbook of culture media for food and water microbiology, 3rd edition* (3rd ed ed.). S.l.]: S.l. : Royal Society of Chemistry.
- Crisafuli, F., Ramos, E., & Rocha, M. (2015). Characterizing the interaction between DNA and GelRed fluorescent stain. *with Biophysics Letters*, 44(1), 1-7. doi:10.1007/s00249-014-0995-4

- Cunliffe, D. A., & Adcock, P. (1989). Isolation of *Aeromonas* spp. from water by using anaerobic incubation. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(9), 2138.
- Dogan, B., & Boor, K. J. (2003). Genetic diversity and spoilage potentials among *Pseudomonas* spp. isolated from fluid milk products and dairy processing plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69(1), 130-138.
- Erkmen, O., & Bozoglu, T. (2016). Section V: Microbial Food Spoilage. In (pp. 267-138). Chichester, UK: Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.
- Farmer, J. J., Arduino, M., & F.W, H.-B. (2006). The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*. In (Vol. 6, pp. 564-596).
- Feldhusen, F. (2000). The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection*, 2(13), 1651-1660.
- Fricke, C., & Tompsett, S. (1989). *Aeromonas* spp. in foods: a significant cause of food poisoning? *International Journal of Food Microbiology*, 9(1), 17-23.
- Frøyen, O. J. (2018). *MATMIKROBIOLOGI: TMAT 3001 kompendium i Matmikrobiologi*.
- Gobat, P., & Jemmi, T. (1995). Comparison of 7 selective media for the isolation of mesophilic *aeromonas* species in fish and meat *Int. J. Food Microbiol.*, 24(3), 375-384.
- Goel, S. (2017). *Advances in Solid and Hazardous Waste Management*. Cham: Cham: Springer International Publishing.
- González-Rodríguez, M., Sanz, J., Santos, J., Otero, A., & García-López, M. (2002). Foodborne pathogenic bacteria in prepackaged fresh retail portions of farmed rainbow trout and salmon stored at 3 C. *International Journal of Food Microbiology*, 76(1-2), 135-141.
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage—interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1), 79-97. doi:10.1016/S0168-1605(02)00233-7
- Götz, F., Bannerman, T., & Schleifer, K. (2006). *The Genera Staphylococcus and Micrococcus* (Vol. 4).
- Held, P. (2018). Using the Cytation 5 Cell Imaging Microplate Reader to Monitor Cell Culture Status. Retrieved from <https://www.biotek.com/resources/application-notes/using-phenol-red-to-assess-ph-in-tissue-culture-media/>
- Hoel, S. (2019). [anvendelse av lugols].

- Hoel, S., Mehli, L., Bruheim, T., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2015). Assessment of microbiological quality of retail fresh sushi from selected sources in Norway. *Journal of food protection*, 78(5), 977-982.
- Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2018). Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage. In *International Journal of Food Microbiology* (pp. 1-6).
- Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2019). The Significance of Mesophilic *Aeromonas* spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood. *Microorganisms*, 7(3), 91.
- Huddleston, J. R., Zak, J. C., & Jeter, R. M. (2007). Sampling bias created by ampicillin in isolation media for *Aeromonas*. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(1), 39-44. doi:10.1139/w06-103
- Hänninen, M.-I., Oivanen, P., & Hirvelä-Koski, V. (1997). *Aeromonas* species in fish, fish-eggs, shrimp and freshwater. *International Journal of Food Microbiology*, 34(1), 17-26.
- Jahid, I. K., Mizan, M. F. R., Myoung, J., & Ha, S.-D. (2019). *Aeromonas hydrophila* biofilm, exoprotease, and quorum sensing responses to co-cultivation with diverse foodborne pathogens and food spoilage bacteria on crab surfaces. *Biofouling*, 1-14. doi:10.1080/08927014.2018.1519069
- Jakobsen, A. (2018). *Kvalitetsforringelse T MAT 3001 Matmikrobiologi*. Paper presented at the Forelesning, NTNU Trondheim.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(9), 2761. doi:10.1128/JCM.01228-07
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The genus *Aeromonas*: taxonomy, pathogenicity, and infection. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 35-73.
- Janet, E. L., Gordon, D. W., & Rosamund, M. (2012). *Culture Media for the Isolation of Aeromonas spp. and Plesiomonas shigelloides* (3rd Edition ed.): Royal Society of Chemistry.
- Kelly, M. T., Stroh, E. M., & Jessop, J. (1988). Comparison of blood agar, ampicillin blood agar, MacConkey-ampicillin-Tween agar, and modified cefsulodin-Irgasan-novobiocin agar for isolation of *Aeromonas* spp. from stool specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(9), 1738.
- LABm. (2017a). *Aeromonas* agar, Bile Salt Irgasan Brilliant Green agar. Retrieved from http://www.labm.com/data/Product_Downloads/LAB167%20Aeromonas%20Agar%20specification_02.pdf

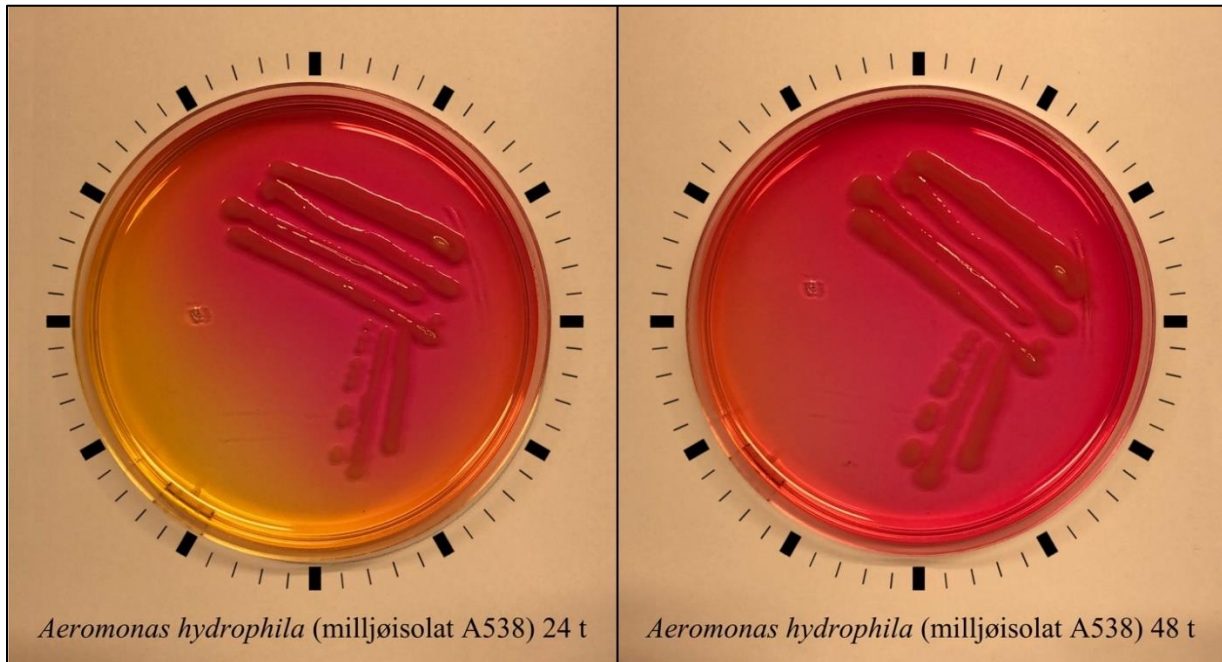
- Labm. (2017b). LAB167 Aeromonas Agar "Bile Salt Irgasan Brilliant Green Agar". Retrieved from http://www.labm.com/data/Product_Downloads/LAB167%20Aeromonas%20Agar%20specification_02.pdf
- Lamps, L. W. (2010). *Surgical Pathology of the Gastrointestinal System: Bacterial, Fungal, Viral, and Parasitic Infections*. In.
- Latif-Eugenín, F., Beaz-Hidalgo, R., & Figueras, M. J. (2016). Evaluation of different conditions and culture media for the recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples. *Journal of Applied Microbiology*, 121(3), 883-891. doi:10.1111/jam.13210
- Liu, D. (2014). *Aeromonas* (Vol. 2-3).
- Liu, S. (2019). All About Agar. Retrieved from <https://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/references/grow-microbes-agar>
- Løvdaal, T. (2015). The microbiology of cold smoked salmon. *Food Control*, 54, 360-373.
- Madigan, M., S Bender, D Buckley, D Stahl. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (Fourteenth edition ed.): Prentice Hall/Pearson Education.
- Martin-Carnahan, A., Joseph, S. W., & Garrity, G. M. (2005). *Aeromonadales ord. nov* (Second Edition ed.). Boston, MA: Boston, MA: Springer US.
- Mattick, K., & J Donovan, T. (1999). *Optimisation of the protocol for detection of Aeromonas species in ready-to-eat salads, and its use to speciate isolates and establish their prevalence* (Vol. 1).
- Mohanta, T., Dutta, D., & Goel, S. (2017). *Fundamentals of microbiology*.
- Mycrobe. (2019). Bile Salt Irgasan Brilliant Green Agar (BSIBG) Retrieved from <https://www.mycrobe.org/blog/2019/2/27/bile-salt-irgasan-brilliant-green-agar-bsibg>
- Nagar, V., Shashidhar, R., & Bandekar, J. R. (2011). Prevalence, characterization, and antimicrobial resistance of *Aeromonas* strains from various retail food products in Mumbai, India. *Journal of food science*, 76(7), M486-M492.
- Nagar, V., Shashidhar, R., & Bandekar, J. R. (2012). Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using rpoD gene sequencing and whole cell protein analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(4), 745-752.
- Neyts, K., Notebaert, E., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2000). Modification of the bile salts–Irgasan–brilliant green agar for enumeration of *Aeromonas*

- species from food. *International Journal of Food Microbiology*, 57(3), 211-218. doi:10.1016/S0168-1605(00)00253-1
- Nordic-Committee-on-Food-Analysis. (2004). *Mesophilic Aeromonas species. Quantification in foods and feeds*. Retrieved from Norwegian Veterinär' Institute, Oslo.:
- NPTEL. (2014). *Microbial nutrition* Retrieved from <https://nptel.ac.in/courses/102103015/9>
- Næringsmiddelhygieneforskriften. (2008). *Forskrift om næringsmiddelhygiene*. Retrieved from <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-12-22-1623>.
- Odeyemi, O. A., Burke, C. M., Bolch, C. J. S., & Stanley, R. (2018). Evaluation of spoilage potential and volatile metabolites production by *Shewanella baltica* isolated from modified atmosphere packaged live mussels. *Food Research International*, 103, 415-425. doi:10.1016/j.foodres.2017.10.068
- Oxoid. (2019). *Aeromonas Isolation Medium Base (Ryan)*. Retrieved from http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM0833&cat=&c=UK&lang=EN
- Palumbo, S. A., Maxino, F., Williams, A. C., Buchanan, R. L., & Thayer, D. W. (1985). Starch-Ampicillin Agar for the Quantitative Detection of *Aeromonas hydrophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(4), 1027.
- Parker, J. L., & Shaw, J. G. (2011). *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *Journal of Infection*, 62(2), 109-118.
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2013a). *Aeromonas*.
- Percival, S. L., & Williams, D. W. (2013b). *Yersinia*.
- Prevention, C. f. D. C. a. (2019). *Laboratory Methods for the Diagnosis of Vibrio cholerae*. Retrieved from <https://www.cdc.gov/cholera/pdf/laboratory-methods-for-the-diagnosis-of-vibrio-cholerae-chapter-6.pdf>
- Sachan, N., & Agarwal, R. K. (2000). Selective enrichment broth for the isolation of *Aeromonas* sp. from chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, 60(1), 65-74. doi:10.1016/S0168-1605(00)00322-6
- Schuller, M., Sloots, T. P., James, G. S., Halliday, C. L., & Carter, I. W. J. (2010). *PCR for Clinical Microbiology : An Australian and International Perspective*. In.
- Sharma, K. K., & Kalawat, U. (2010). Emerging infections: *Shewanella*—a series of five cases. *Journal of laboratory physicians*, 2(2), 61.
- Stackebrandt, E., & Jones, D. (2006). The Genus *Brochothrix*. In M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, & E. Stackebrandt (Eds.), *The Prokaryotes: Volume 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria* (pp. 477-491). New York, NY: Springer US.

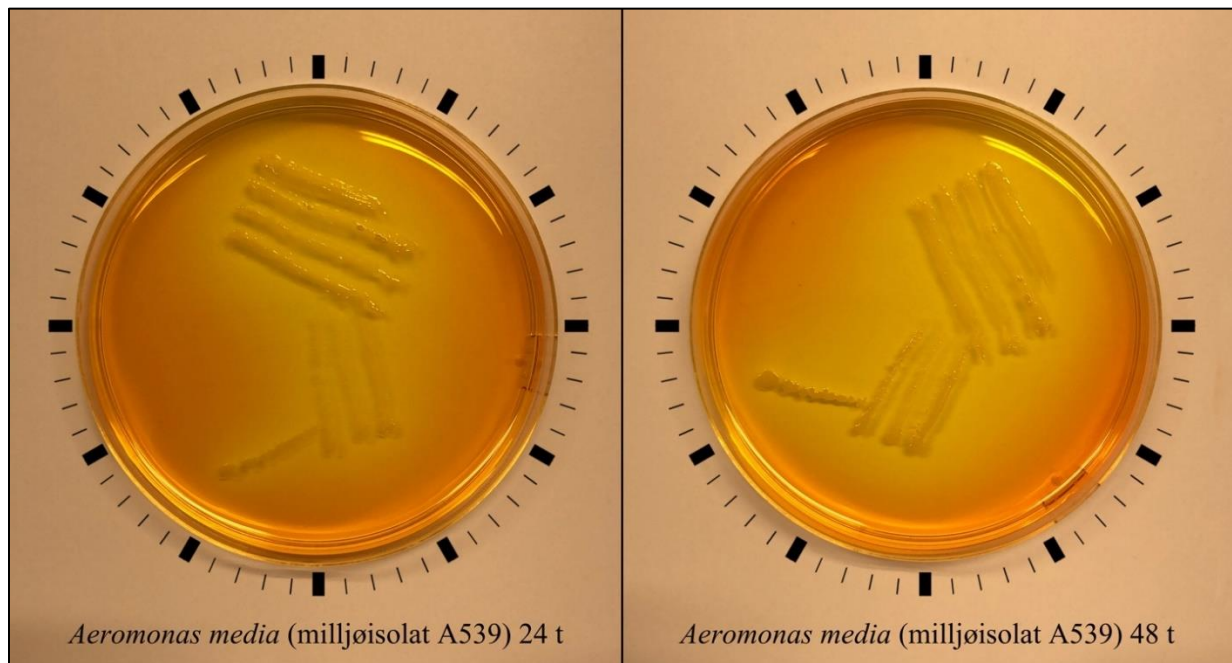
- Starch ampicillin agar (SAA)*. (2003). (Vol. 37). London.
- Tang, Y.-W., & Stratton, C. W. (2018). *Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology : Volume 1: Techniques*. In.
- Tofteland, S., & Ui, T. N. a. u. D. h. f. (2015). *Extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Norway : aspects of detection and epidemiology*. UIT The Arctic University of Norway, Tromsø.
- Tronsmo, A. (2016). *Innføring i mikrobiologi*. Universitetsforlaget Retrieved from <https://www.universitetsforlaget.no/content/download/173869/1015513/file/Svar%20til%20sp%C3%B8rsma%CC%8A%20i%20mikrobiologi.pdf>.
- Villari, P., Pucino, A., Santagata, N., & Torre, I. (1999). A comparison of different culture media for the membrane filter quantification of *Aeromonas* in water. *Letters in applied microbiology*, 29(4), 253-257.
- Vogel, B. F., Jørgensen, K., Christensen, H., Olsen, J. E., & Gram, L. (1997). Differentiation of *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella alga* on the basis of whole-cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6), 2189-2199.
- Vogel, B. F., Venkateswaran, K., Satomi, M., & Gram, L. (2005). Identification of *Shewanella baltica* as the Most Important H₂S-Producing Species during Iced Storage of Danish Marine Fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(11), 6689. doi:10.1128/AEM.71.11.6689-6697.2005
- Want, S. V., & Millership, S. E. (1990). Effects of incorporating ampicillin, bile salts and carbohydrates in media on the recognition and selection of *Aeromonas* spp. from faeces. *Journal of medical microbiology*, 32(1), 49. doi:10.1099/00222615-32-1-49
- Wikipedia. (u.å.). *Aeromonas*. Retrieved from <https://en.wikipedia.org/wiki/Aeromonas>
- World-Health-Organization. (2018). Antibiotic resistance. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Xanthopoulos, V., Tzanetakis, N., & Litopoulou-Tzanetaki, E. (2010). Occurrence and characterization of *Aeromonas hydrophila* and *Yersinia enterocolitica* in minimally processed fresh vegetable salads. *Food Control*, 21(4), 393-398.

Billedokumentasjon av typiske *Aeromonas*-arter på utvalgte selektiver medier

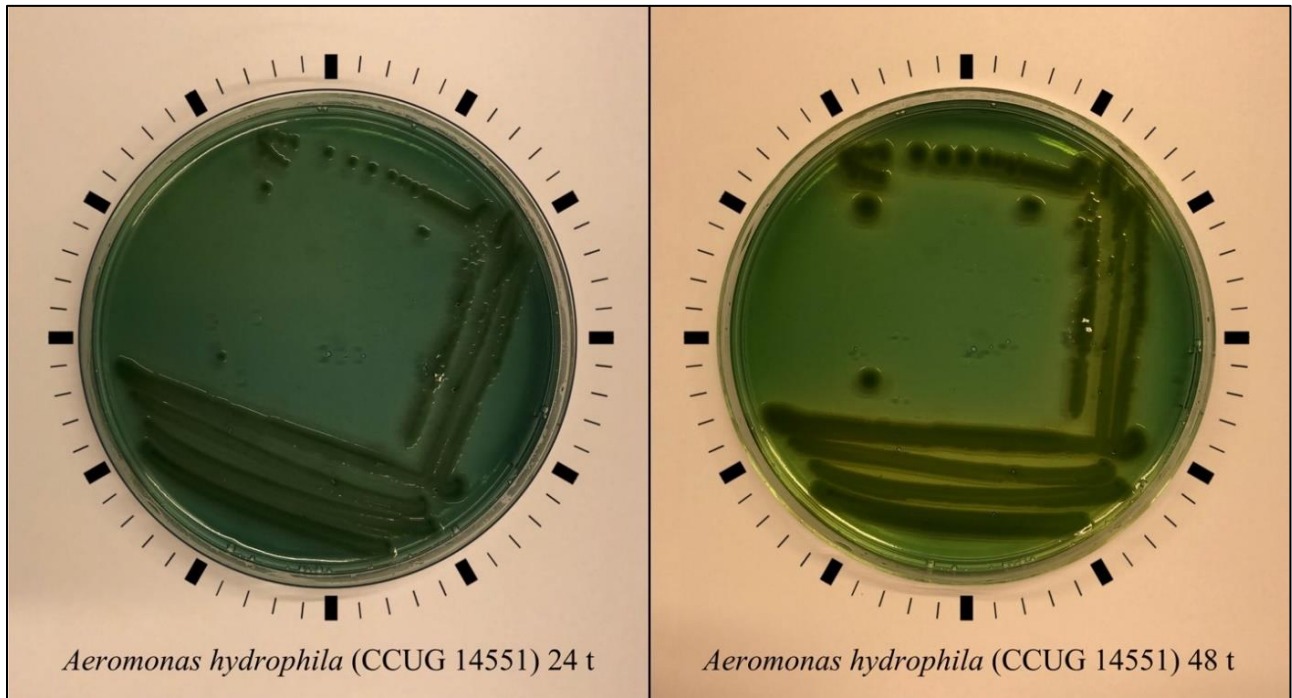
Aeromonas hydrophila på stivelse ampicillin agar



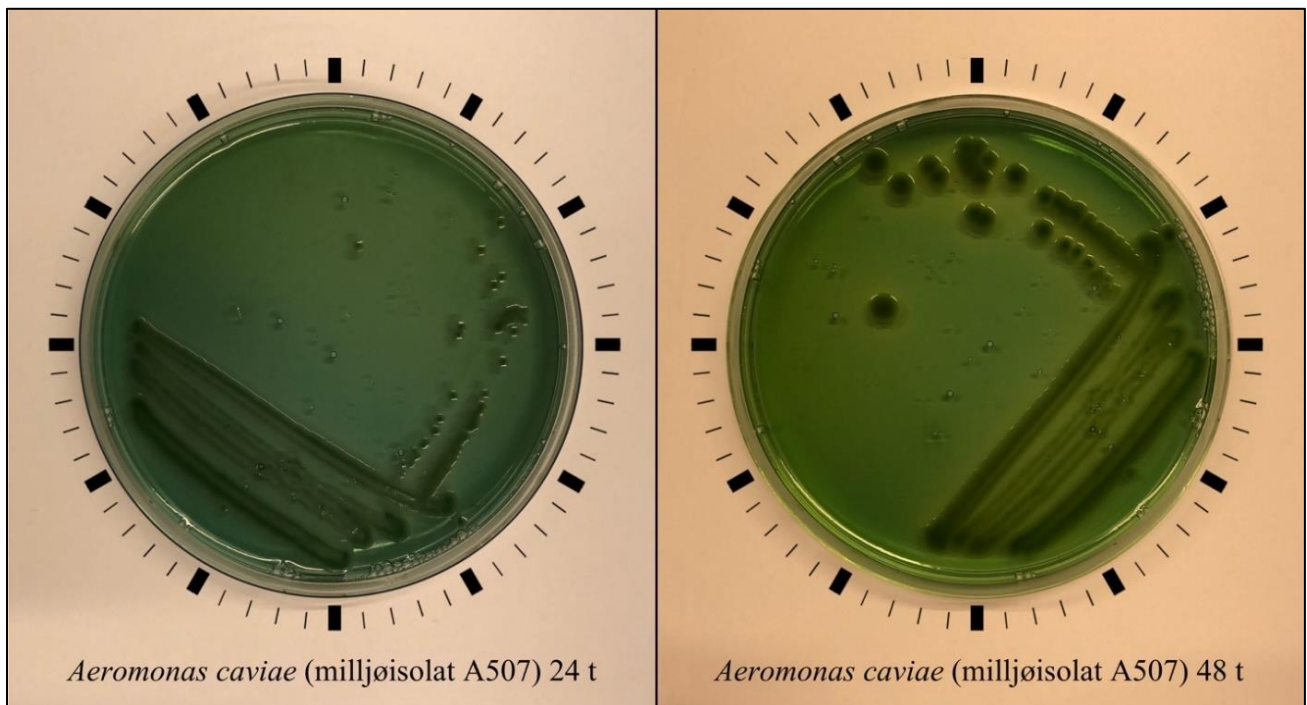
Aeromonas media på stivelse ampicillin agar



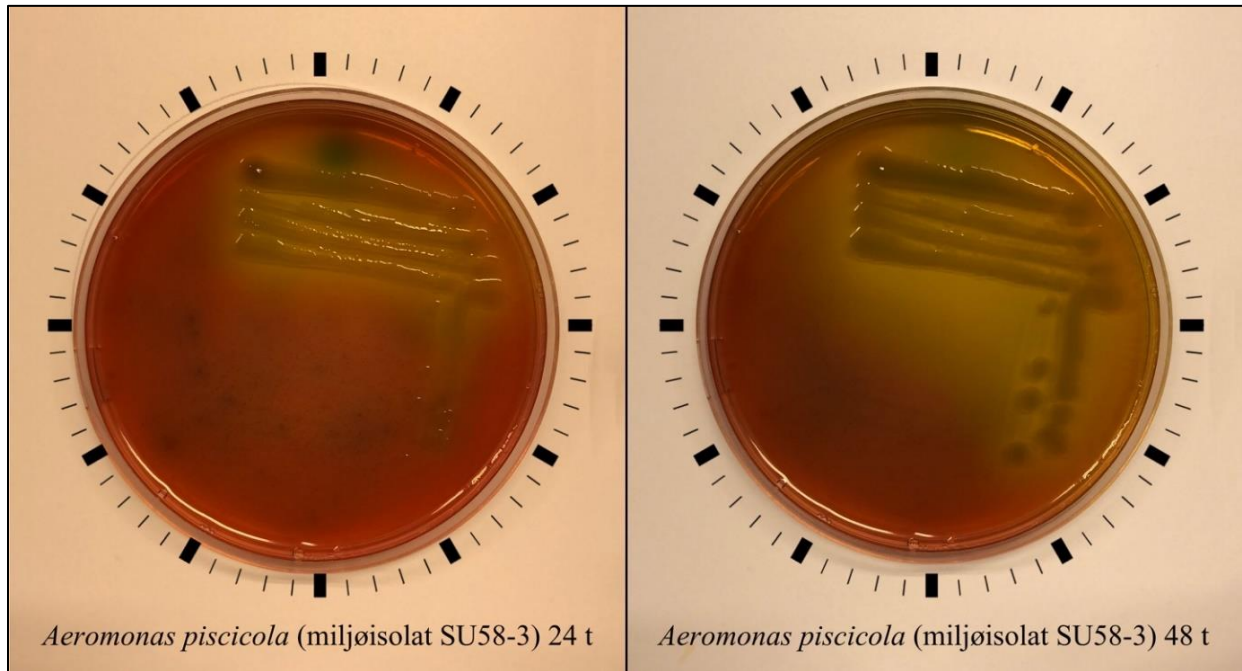
Aeromonas hydrophila på Ryan agar



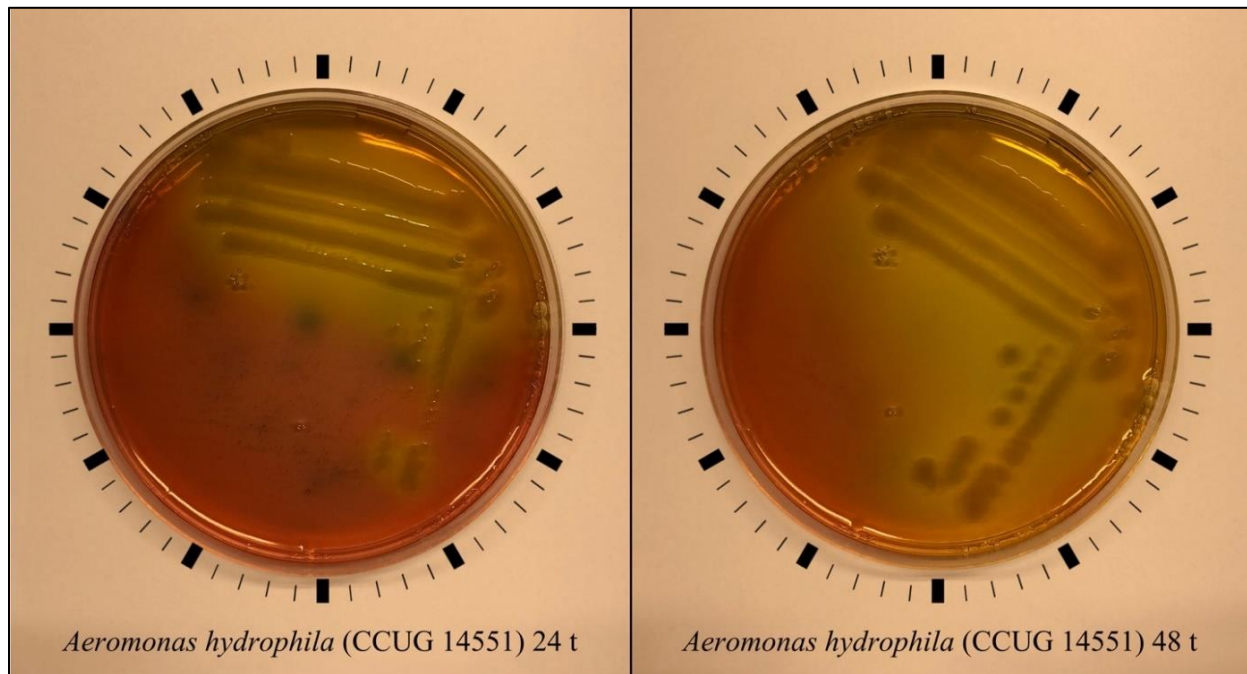
Aeromonas caviae på Ryan agar



***Aeromonas piscicola* på Bile Salt Irgasan Brilliant Green agar**



***Aeromonas hydrophila* på Bile Salt Irgasan Brilliant Green agar**



Fullstendige resultater etter identifisering av plukkede kolonier.

Miljøprøver av reker

Prøve	Miljøprøve	Koloniutseende	Oksidase pos/neg	Antatt mikroorganisme	Basepar lengde	% identitet
7	Reker «A 10 ⁻³ » BSIBG	Stor glatt koloni med en lilla prikk i sentrum	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	939	98,40 %
8	Reker «A 10 ⁻³ » BSIBG	Stor røff og lilla koloni, noe tørr	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	802	99,62 %
9	Reker «A 10 ⁻³ » BSIBG	Liten glatt og lilla koloni	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	922	99,46 %
1	Reker «B 10 ⁻³ » BSIBG	Stor glatt koloni med en lys glorie og gul sone	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	797	99,75 %
2	Reker «B 10 ⁻³ » BSIBG	Stor utflytende lilla koloni uten sentrum eller sone	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	939	99,26 %
3	Reker «B 10 ⁻³ » BSIBG	Mellomstor hvit og glatt koloni	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	884	99,55 %
4	Reker «C 10 ⁻³ » SAA	Stor glatt og hvit koloni med et sterkt sentrum og rosa sone	Positiv	<i>Pseudomonas (cedrina)</i>	931	99,14 %
5	Reker «C 10 ⁻³ » SAA	Mellomstor røff, hvit koloni med et stjerneutseende i sentrum og rosa sone	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	919	98,90 %
6	Reker «C 10 ⁻³ » SAA	Mellomstor glatt hvit/blank koloni og rosa sone	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	817	99,63 %
23	Reker «C 10 ⁻² » BSIBG	Liten og røff koloni med et lilla sentrum og en blank glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	1038	99,52 %

24	Reker «C 10 ⁻² » BSIBG	Mellomstor blank og glatt koloni med et stjernemønster i sentrum	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	801	99,38 %
25	Reker «C 10 ⁻² » BSIBG	Liten rød koloni med et lilla sentrum	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	929	99,46 %
26	Reker «C 10 ⁻² » BSIBG	Mellomstor glatt koloni med et lilla sentrum og en hvit glorie	Positiv	<i>Mangler</i>	Mangler	Mangler
30	Reker «C 10 ⁻⁴ » SAA	Glatt og stor strålende koloni med ringer gjennom hele kolonien	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	1009	99,50 %
31	Reker «C 10 ⁻⁴ » SAA	Mellomstor røff og tykk koloni med et blomsterlignende sentrum	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	936	99,25 %
32	Reker «C 10 ⁻³ » RYAN	Liten grønn koloni med et kraftig grønt sentrum og en lys glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	1063	99,34 %
33	Reker «C 10 ⁻³ » RYAN	Liten grønn koloni med en lys glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	1034	99,32 %

Miljøprøver av salat

Prøve	Miljøprøve	Koloniutseende	Oksidase pos/neg	Antatt mikroorganisme	Basepar lengde	% identitet
11	Salat «A 10 ⁻⁴ » BSIBG	Liten glatt koloni med et lite noe mørkere sentrum	Positiv	<i>Pseudomonas (yamanorum)</i>	799	99,87 %
12	Salat «A 10 ⁻⁴ » BSIBG	Liten, glatt koloni med et mørkt sentrum og stor lys glorie rundt kolonien	Positiv	<i>Pseudomonas (yamanorum)</i>	798	100,00 %
10	Salat «B 10 ⁻³ » SAA	Overgrodd plate med små hvite kolonier	Negativ	<i>Pseudomonas (koreensis)</i>	775	99,61 %
27	Salat «B 10 ⁻⁴ » RYAN	Liten glatt og blank koloni	Positiv	<i>Pseudomonas (yamanorum)</i>	837	99,64 %
28	Salat «B 10 ⁻⁴ » RYAN	Liten og kraftig grønn koloni men en noe lysere glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (koreensis)</i>	275	100,00 %
29	Salat «B 10 ⁻⁴ » RYAN	Liten grønn koloni men en lysegrønn glorie	Positiv	<i>Rahnella (inusitata)</i>	1035	99,61 %

Miljøprøver av spirer

Prøve	Miljøprøve	Koloniutseende	Oksidase pos/neg	Antatt mikroorganisme	Basepar lengde	% identitet
16	Spirer «A 10 ⁻³ » RYAN	Mellomstor grønn koloni med et kraftig og stort mørkt sentrum	Negativ	<i>Klebsiella (pneumoniae)</i>	1101	99,09 %
17	Spirer «A 10 ⁻³ » RYAN	Liten grønn koloni med et lite mørkt sentrum	Negativ	<i>Enterobacter (cloacae)</i>	884	99,43 %
14	Spirer «B 10 ⁻⁴ » SAA	Mellomstor glatt, hvitgul koloni med en blank glorie	Negativ	<i>Enterobacter (homaechei)</i>	981	99,49 %
15	Spirer «B 10 ⁻⁴ » SAA	Liten hvit og glatt koloni	Negativ	<i>Enterobacter (homaechei)</i>	1040	99,81 %
13	Spirer «C 10 ⁻⁴ » SAA	Mellomstor glatt koloni med et hvitt sentrum og blank glorie	Negativ	<i>Klebsiella (pneumoniae)</i>	1037	99,61 %

Miljøprøver av lakseloin

Prøve	Miljøprøve	Koloniutseende	Oksidase pos/neg	Antatt mikroorganisme	Basepar lengde	% identitet
22	Loin «A 10 ⁻² » SAA	Stor og glatt koloni med ringer av hvit og blank farge gjennom hele kolonien	Positiv	<i>Pseudomonas (yamanorum)</i>	1055	99,53 %
18	Loin «C 10 ⁻² » RYAN	Mellomstor gul koloni med en blank glorie	Negativ	<i>Serratia (fonticola)</i>	774	99,35 %
19	Loin «C 10 ⁻² » RYAN	Liten grønn koloni med en lysegrønn glorie	Positiv	<i>Pseudomonas</i>	57	96,55 %
20	Loin «C 10 ⁻² » SAA	Stor glatt koloni med et hvitt sentrum og noe lysere glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (mucidolens)</i>	873	99,77 %
21	Loin «C 10 ⁻² » SAA	Mellomstor glatt, noe tørr koloni med et hvitt sentrum og blank glorie	Positiv	<i>Pseudomonas</i>	64	100,00 %

Miljøprøver av ishavsrøye

Prøve	Miljøprøve	Koloniutseende	Oksidase pos/neg	Antatt mikroorganisme	Basepar lengde	% identitet
35	Røye «A 10 ⁻³ » SAA	Mellomstor glatt og tørr koloni, hvit med blank glorie og sirkler gjennom kolonien	Negativ	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	890	99,66 %
36	Røye «A 10 ⁻³ » SAA	Mellomstor glatt koloni med flere hvit og blanke ringer gjennom kolonien	Negativ	<i>Pseudomonas (psychrophila)</i>	914	99,56 %
37	Røye «A 10 ⁻³ » SAA	Mellomstor blank/hvit koloni med en lys glorie	Negativ	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	1017	99,51 %
38	Røye «A 10 ⁻³ » SAA	Mellomstor noe flytende og avlang, hvit/blank farge	Negativ	<i>Pseudomonas (psychrophila)</i>	1022	99,90 %
39	Røye «A 10 ⁻⁴ » SAA	Stor glatt koloni med et hvitt sentrum og ringer gjennom kolonien	Positiv	<i>Pseudomonas (corrugata)</i>	888	99,55 %
50	Røye «A 10 ⁻² » BSIBG	Stor og glatt koloni med en blank/hvit farge med et hint av lilla, noe svermende	Positiv	<i>Pseudomonas (yamanorum)</i>	1039	100,00 %
51	Røye «A 10 ⁻² » BSIBG	Liten glatt koloni med et lilla sentrum og en hvit glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	993	99,19 %
52	Røye «A 10 ⁻² » BSIBG	Veldig liten helhvitt koloni uten synlig glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (azotoforans)</i>	896	99,11 %
40	Røye «B 10 ⁻² » RYAN	Blank liten glatt koloni	Positiv	<i>Pseudomonas (brenneri)</i>	906	99,23 %
41	Røye «B 10 ⁻² » RYAN	Liten blank/grønn og glatt koloni	Negativ	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	870	99,54 %

42	Røye «B 10 ⁻² » RYAN	Liten glatt med hvite og grønne sirkler gjennom kolonien	Positiv	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	1094	99,91 %
43	Røye «B 10 ⁻² » RYAN	Liten glatt koloni med et kraftig grønt sentrum og lys glorie	Negativ	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	1060	99,43 %
44	Røye «B 10 ⁻² » SAA	Liten helhvitt glatt koloni	Positiv	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	1023	99,31
45	Røye «B 10 ⁻² » SAA	Liten glatt koloni med et blankt sentrum og en noe hvitere glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	1022	99,22 %
46	Røye «B 10 ⁻² » SAA	Mellomstor med et hvitt sentrum og en lysere glorie. Glorien ble lysere jo lengere ut en kommer.	Negativ	<i>Pseudomonas (psychrophila)</i>	951	99,79 %
47	Røye «B 10 ⁻³ » BSIBG	Glatte sammenvokste kolonier med en lilla farge og en noe lysere glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (psychrophila)</i>	995	99,70 %
48	Røye «B 10 ⁻³ » BSIBG	Mellomstor glatt koloni med et lilla sentrum og noe lysere glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	640	98,90 %
49	Røye «B 10 ⁻³ » BSIBG	Blank/hvit med et hint av lilla, svermende med en hvitere glorie enn senter	Positiv	<i>Pseudomonas (fluorescens)</i>	549	99,63 %
34	Røye «C 10 ⁻⁴ » SAA	Mellomstor glatt koloni med et dominant rødt sentrum og lysere farge jo lengre ut i kolonien en kommer	Negativ	<i>Pseudomonas (fragi)</i>	1019	99,80 %

Kunstig kontaminerte miljøprøver av laks

Prøve	Miljøprøve	Koloniutseende	Oksidase pos/neg	Antatt mikroorganisme	Basepar lengde	% identitet
77	Laks «A 10 ⁻² » RYAN	Liten kraftig svart koloni med en blank glorie	Negativ	<i>Shewanella (hafniensis)</i>	1077	98,42 %
78	Laks «A 10 ⁻² » RYAN	Veldig liten gul koloni med blank glorie	Negativ	<i>Yersinia (Intermedia)</i>	1004	99,60 %
79	Laks «A 10 ⁻² » RYAN	Mellomstor lys grønn koloni med blank glorie	Positiv	<i>Aeromonas (hydrophila)</i>	841	99,64 %
80	Laks «A 10 ⁻² » RYAN	Kraftig svart koloni med blank glorie	Positiv	<i>Shewanella (putrefaciens)</i>	923	98,15 %
81	Laks «A 10 ⁻² » SAA	Røff og ujevn med sirkler og rosa sone	Positiv	<i>Pseudomonas (mucicolens)</i>	298	98,66 %
83	Laks «A 10 ⁻³ » RYAN	Liten svart koloni med blank glorie	Mulig Positiv	<i>Shewanella (putrefaciens)</i>	1033	98,25 %
53	Laks «B 10 ⁻⁴ » RYAN	Mellomstor grønn koloni med avtagene farge og lys glorie	Positiv	<i>Aeromonas (encheleia)</i>	836	99,88 %
54	Laks «B 10 ⁻² » SAA	Stor hvit og glatt koloni med rosa sone	Positiv	<i>Aeromonas (hydrophila)</i>	901	99,56 %
55	Laks «B 10 ⁻⁴ » RYAN	Liten svart koloni med en lys glorie	Negativ	<i>Shewanella (hafniensis)</i>	962	98,13 %
56	Laks «B 10 ⁻⁴ » RYAN	Liten svart koloni med en veldig tynn glorie	Positiv	<i>Aeromonas (encheleia/hydrophila)</i>	951	99,58 % /99,36 %
57	Laks «B 10 ⁻⁴ » RYAN	Liten grønn koloni med lysegrønn glorie	Positiv	<i>Aeromonas (salmonicida)</i>	929	99,57 %

60	Laks «B 10 ⁻⁵ » SAA	Hvit stor og glatt koloni med en svak rosa sone	Positiv	<i>Aeromonas (salmonicida)</i>	905	100,00 %
65	Laks «B 10 ⁻³ » RYAN	Liten svart koloni med blank glorie	Negativ	<i>Shewanella (hafniensis)</i>	1071	99,41%
66	Laks «B 10 ⁻³ » RYAN	Lys grønn koloni med en noe lysere glorie, noe røff	Positiv	<i>Aeromonas (hydrophila)</i>	1110	99,53 %
67	Laks «B 10 ⁻³ » SAA	Liten glatt og gul koloni med blank glorie	Positiv	<i>Yersinia (intermedia)</i>	1104	99,82 %
68	Laks «B 10 ⁻³ » SAA	Stor røff koloni med sterkt gult sentrum	Positiv	<i>Aeromonas (salmonicida)</i>	1039	99,61 %
58	Laks «C 10 ⁻² » SAA	Helgul koloni med lys glorie og gul sone	Positiv	<i>Aeromonas (hydrophila)</i>	953	99,58 %
59	Laks «C 10 ⁻² » SAA	Helgul koloni med noe lysere glorie og gul sone	Positiv	<i>Aeromonas (hydrophila)</i>	816	99,26 %
61	Laks «C 10 ⁻⁴ » BSIBG	Stor gul koloni med lys glorie og gul sone	Positiv	<i>Aeromonas (salmonicida)</i>	1001	100 %
62	Laks «C 10 ⁻⁴ » SAA	Gul mellomstor koloni med lys glorie og gul sone	Positiv	<i>Ikke sendt inn</i>		
63	Laks «C 10 ⁻⁴ » SAA	Stor hvit/rosa koloni med kraftig rosa sone	Positiv	<i>Aeromonas (hydrophila)</i>	1017	99,80 %
64	Laks «C 10 ⁻⁴ » RYAN	Lys grønn og mellomstor koloni med en lysegrønn glorie	Positiv	<i>Ikke sendt inn</i>		
69	Laks «C 10 ⁻³ » BSIBG	Stor gul og noe røff koloni men en lys glorie og gul sone	Positiv	<i>Aeromonas (encheleia/hydrophila)</i>	883	99,09 % /98,87 %

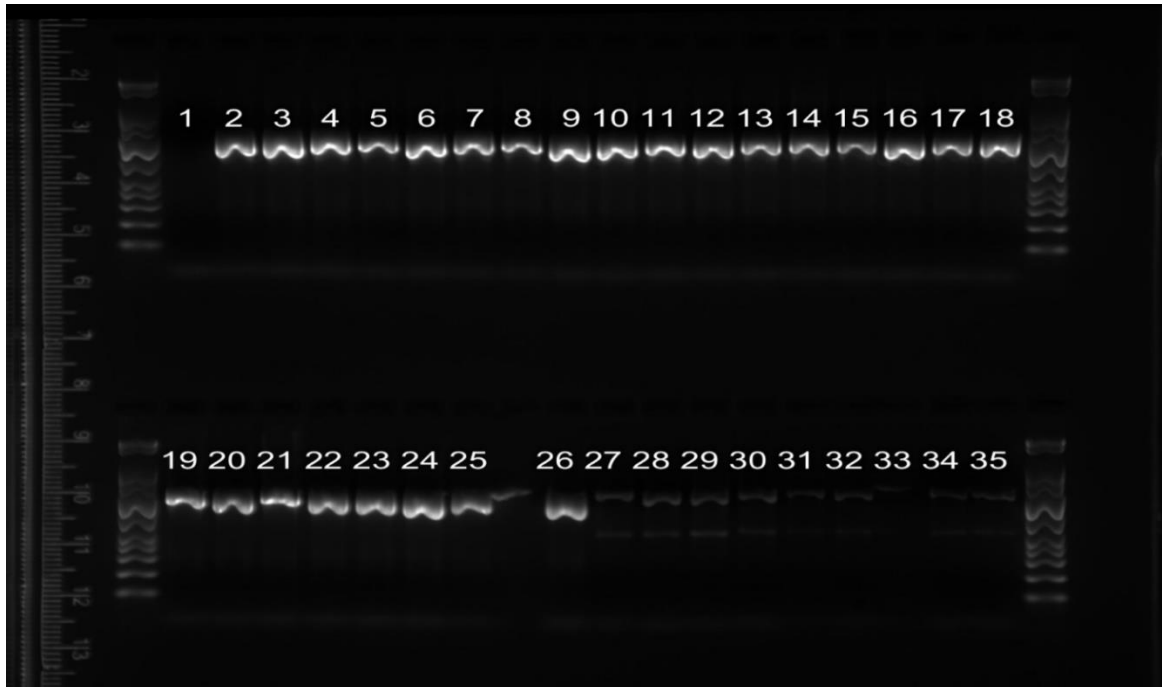
70	Laks «C 10 ⁻³ » BSIBG	Mellomstor helgul koloni med en tynn lys glorie	Positiv	<i>Aeromonas (Salmonicida)</i>	1005	99,10 %
84	Laks «D 10 ⁻³ » BSIBG	Stor gul koloni med blank glorie	Positiv	<i>Aeromonas (hydrophila)</i>	1020	99,71 %

Miljøprøver av laks uten tilsatt inokulum

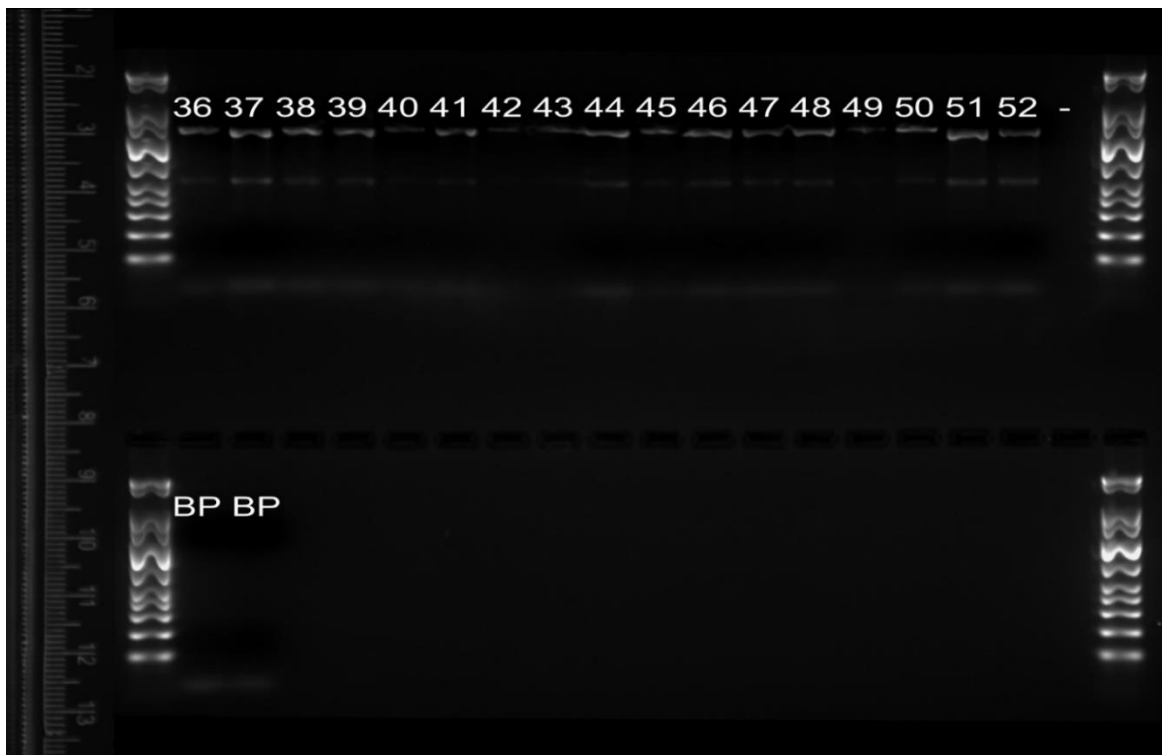
Prøve	Miljøprøve	Koloniutseende	Oksidase pos/neg	Antatt mikroorganisme	Basepar lengde	% identitet
71	Laks «α 10 ⁻⁵ » BSIBG	Liten gul koloni med noe avtagende farge lengere ut i kolonien	Positiv	<i>Pseudomonas (azotoformans)</i>	938	99,15 %
72	Laks «α 10 ⁻⁴ » BSIBG	Stor røff gul/lilla koloni med gul sone	Positiv	<i>Pseudomonas (fluorescens)</i>	945	99,47 %
73	Laks «α 10 ⁻⁴ » BSIBG	Mellomstor gul koloni med blank glorie	Positiv	<i>Pseudomonas (azotoformans)</i>	479	100,00 %
76	Laks «α 10 ⁻⁴ » SAA	Liten hvit/rosa koloni med rosa sone	Positiv	<i>Pseudomonas (azotoformans)</i>	862	99,77 %
74	Laks «β 10 ⁻³ » BSIBG	Mellomstor gul/lilla koloni med en blank glorie og gul sone	Positiv	<i>Pseudomonas (azotoformans)</i>	946	99,68 %
75	Laks «β 10 ⁻³ » BSIBG	Gul mellomstor med noe lilla-skjær og blank glorie med en gul sone	Positiv	<i>Pseudomonas (azotoformans)</i>	909	99,78 %
82	Laks «β 10 ⁻³ » RYAN	Liten svart koloni med blank glorie	Mulig Positiv	<i>Shewanella (putrefaciens)</i>	1030	98,05 %

Gelbilder etter elektroforese

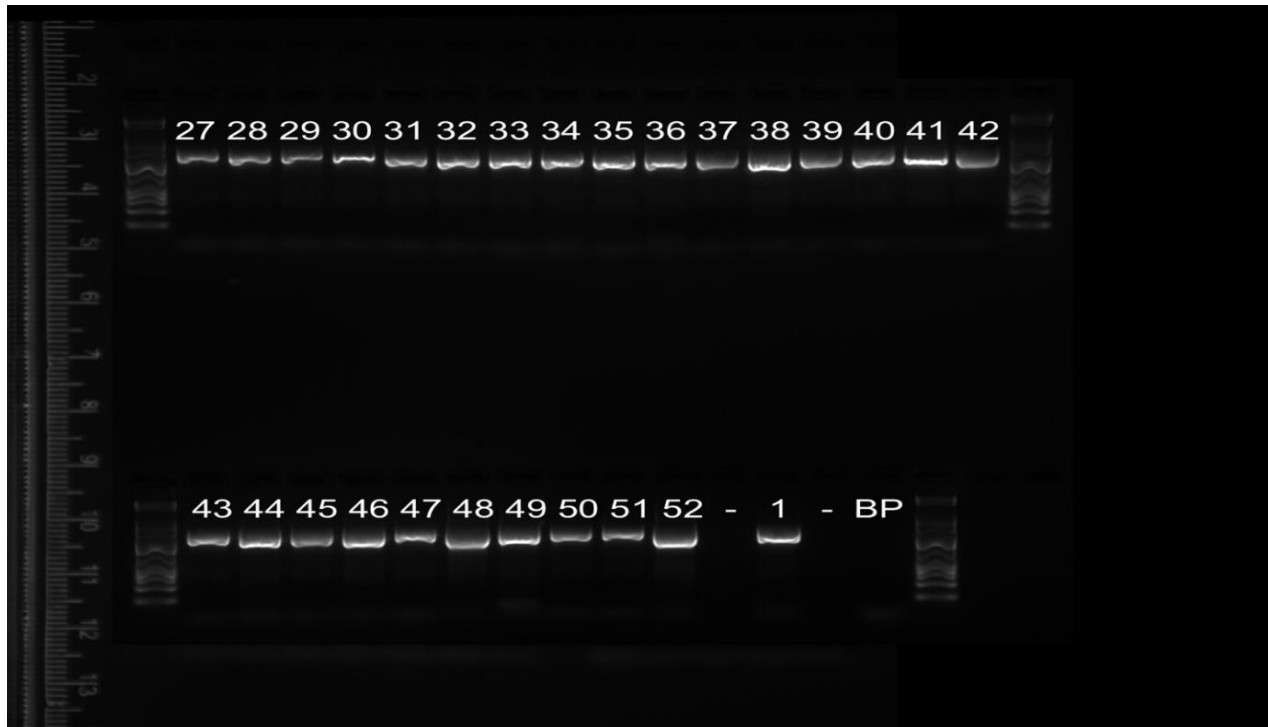
Gel-elektroforeseresultater prøve 1-35



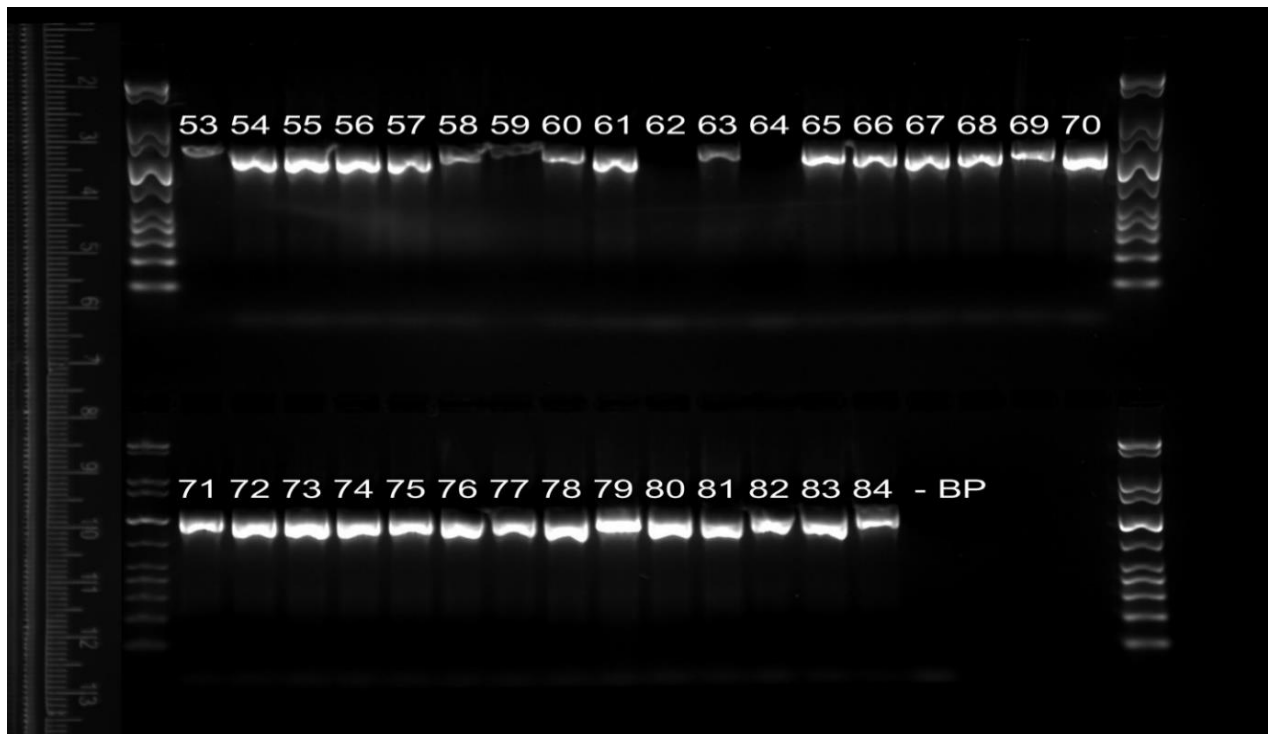
Gel-elektroforeseresultater prøve 36-52



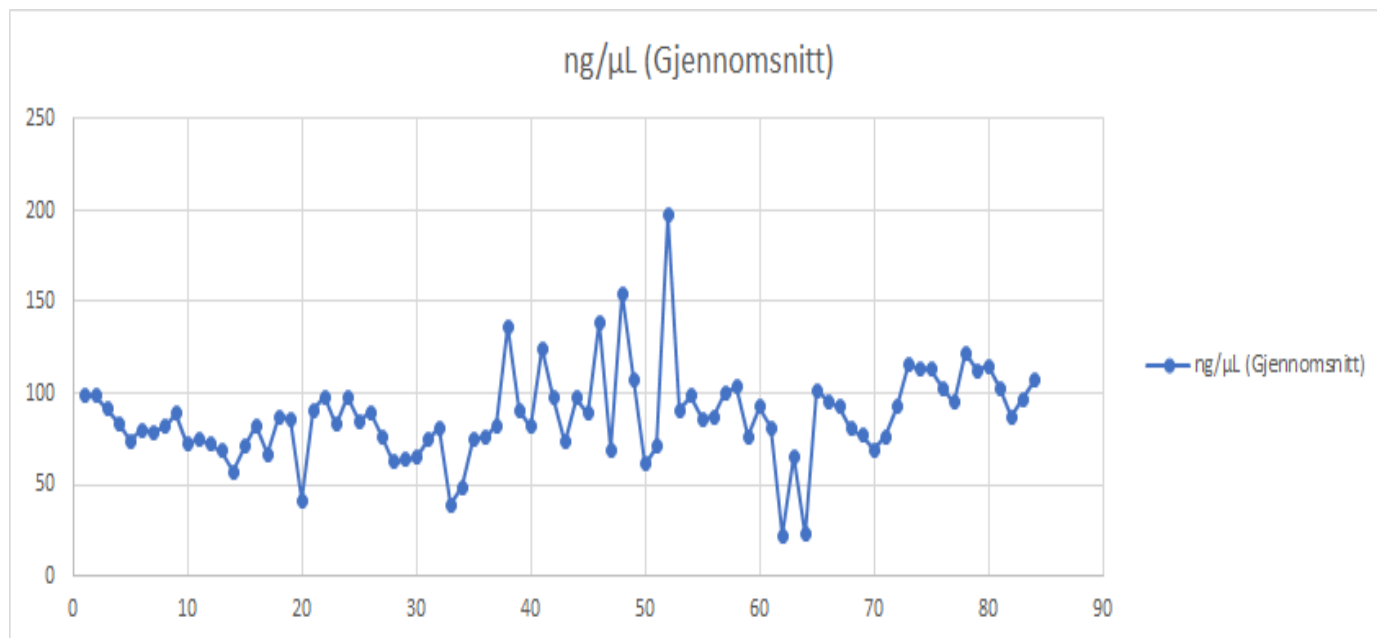
Gel-elektroforeseresultater prøve 27-52 og 1, ny omgang pga. tidligere dårlige resultater



Gel-elektroforeseresultater prøve 53-84



Konsentrasjoner av PCR-produkt



Utregninger av Inokulumskonsentrasjoner

Estimert konsentrasjon inokulum:

$$\text{Prøve 1: } 9,04 * 10^3 \text{ cfu/ml}$$

$$\text{Prøve 2: } 9,04 * 10^4 \text{ cfu/ml}$$

$$\text{Prøve 3: } 9,04 * 10^5 \text{ cfu/ml}$$

$$\text{Prøve 4: } 9,04 * 10^6 \text{ cfu/ml}$$

Faktisk konsentrasjon inokulum

$$\text{Prøve 1} = \frac{68+11}{10^{-2}+10^{-3}} \approx 7,2 * 10^3 \text{ cfu/ml}$$

$$\text{Prøve 2} = \frac{67+8}{10^{-3}+10^{-4}} \approx 6,8 * 10^4 \text{ cfu/ml}$$

$$\text{Prøve 3} = \frac{63+4}{10^{-4}+10^{-5}} \approx 6,1 * 10^5 \text{ cfu/ml}$$

$$\text{Prøve 4} = \frac{69}{10^{-5}} = 6,9 * 10^6 \text{ cfu/ml}$$