



NTNU - Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Institutt for bioteknologi og matvitenskap

BACHELOROPPGAVE 2020

20 studiepoeng

Aeromonas som en matbåren organisme og bruk av dyrkingsmedier til isolering

Utført av

Praewa Janthed
Christine Eikås Tennfjord

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

Målet med denne bacheloroppgaven var å kartlegge *Aeromonas* som en matbåren organisme, samt sammenligne ulike dyrkingsmedier som brukes for å påvise *Aeromonas*-arter i næringsmidler.

Aeromonas er en bakterie-slekt som finnes overalt i naturen, og kan vokse i ulike næringsmidler grunnet dens evne til å vokse i ulike atmosfærer. Patogene arter som *A. hydrophila* og *A. caviae* kan også produsere ulike typer toksin og enzym for å beskytte seg mot fiendtlige miljøer og lette deres invasjon av vertsceller. På grunn av dette kan *Aeromonas* utgjøre en fare med tanke på kvalitetsforringelse og mattrygghet til produkter, spesielt spiseklare matvarer som lagres ved kjøletemperatur og som ikke skal varmebehandles før konsum.

Det finnes mange ulike dyrkingsmedier som brukes for isolering av *Aeromonas* i næringsmidler, men Nordisk Metodikkomité for næringsmidler (NMKL) og det amerikanske forbundet APHA (American Public Health Association) anbefaler å bruke Stivelse Ampicillin Agar (SAA) for isolering av *Aeromonas* fra matvarer. For anrikning foreslår de å bruke Ampicillin Peptone Water (APW) og Trypticase Soy Broth Ampicillin (TSBA) med 30 mg/L ampicillin. Den tidligere folkehelse-laboratorietjenesten i Storbritannia anbefaler å bruke Bile Salts Irgasan Brilliant Green (BSIBG) og *Aeromonas* Medium Base (Ryan) for å påvise *Aeromonas* i næringsmidler.

Mange har også gjort en sammenligning av ulike dyrkingsmedier for å se hvilke medier som har god selektivitets- og differensierings evnen, og etter å ha gjennomgå ulike litteratur kan det konkluderes at Bile Salts Irgasan Brilliant Green (BSIBG) og Ampicillin Dextrin Agar (ADA) er de mest effektive mediene for isolering av *Aeromonas* fra mat- og vannprøver. For anrikning er APW det mest lovende mediet.

Abstract

The objective of this bachelor thesis was to map out *Aeromonas* as a foodborne pathogen and comparing different culture media used for isolating *Aeromonas* from foodstuffs.

The genus *Aeromonas* can be found everywhere in nature and can grow in different types of food due to its ability to grow in different atmospheres. Pathogenic species such as *A. hydrophila* and *A. caviae* can also produce various types of toxin and enzyme to protect themselves from hostile environments and facilitate their invasion of host cells. Because of this, *Aeromonas* can pose a danger in terms of quality deterioration and food safety of products, especially in ready-to-eat foods that are stored at the refrigerator temperature and that are not intended for heat-treatment before consumption.

There are many culture media used for isolating *Aeromonas* from food and water, but Nordic Committee on Food Analysis (NMKL) and the American Public Health Association (APHA) suggest Starch Ampicillin Agar (SAA) for isolating *Aeromonas* from foods. As enrichment media they suggest Ampicillin Peptone Water (APW) and Trypticase Soy Broth Ampicillin (TSBA) with 30 mg/L of ampicillin. The former Public Health Laboratory Service in The United Kingdom recommend Bile Salts Irgasan Brilliant Green (BSIBG) og *Aeromonas* Medium Base (Ryan) for isolating *Aeromonas* from foodstuffs.

Many have compared different culture media to assess which media has the foremost selective and differentiation ability, and after reviewing various literature it can be concluded that Bile Salts Irgasan Brilliant Green (BSIBG) and Ampicillin Dextrin Agar (ADA) is the most effective media for isolation of *Aeromonas* from food and water samples. For enrichment, is APW considered the most promising media.

Forord

Denne oppgaven dekker 20 studiepoeng og er en del av bachelorprogrammet Matteknologi ved instituttet for Bioteknologi og Matvitenskap, fakultet for naturvitenskap. Den tok plass ved NTNU våren 2020.

Vi vil gjerne takke vår hovedveileder Sunniva Hoel for all hjelpen med oppgaven og motiverende ord. Selv om ting ikke ble helt som planlagt har dette vært en lærerik og givende prosess som vi vil ta med oss videre.

Trondheim, 20 mai 2020

Praewa Janthed



Christine Eikås Tennfjord



Innholdsfortegnelse

1 INNLEDNING	1
2 INTRODUKSJON TIL AEROMONAS-SLEKTEN	3
2.1 AEROMONAS HISTORIE.....	3
2.2 MORFOLOGI OG STRUKTUR.....	6
2.2.1 Flagell.....	6
2.2.2 Pili.....	6
2.2.3 Kapsel	7
2.2.4 S-lag.....	7
2.2.5 Lipopolysakkarid.....	7
2.2.6 Ytre membranprotein (Omps).....	7
2.3 PATOGENITET OG VIRULENSFAKTOR	8
2.3.1 Cytotoksisk enterotoksin	8
2.3.2 Cytotonisk enterotoksin	8
2.3.3 Hemolysin.....	9
2.3.4 Protease	9
2.3.5 Lipase	9
2.3.6 Andre virulensfaktorer	10
3 AEROMONAS I NÆRINGSMIDLER	11
3.1 FOREKOMST	11
3.2 VEKST OG OVERLEVELSE I NÆRINGSMIDLER.....	13
3.3 MATBÅRNE UTBRUDD FORÅRSAKET AV AEROMONAS	14
3.4 AEROMONAS SPP. OG HUMAN SYKDOM.....	15
3.5 BEHANDLING OG FOREBYGGING.....	16
4 DYRKINGSMEDIER	17
4.1 MAKRONÆRINGSSTOFFER OG MIKRONÆRINGSSTOFFER.....	17
4.2 TYPER DYRKINGSMEDIER	18
4.3 VEKSTFORHOLD	19
4.3.1 Inkubasjonstemperatur	19
4.3.2 Atmosfære	19
4.4 DIFFERENSIERINGS KOMPONENTER	19
4.4.1 Karbohydrat	19
4.4.2 b-Hemolyse	20
4.4.3 DNA	20
4.4.4 Tween 80	20
4.5 SELEKTIVEMIDLER.....	20
4.5.1 Antimikrobiell	20
4.5.2 Surfaktant	20
4.5.3 Fargestoff	21
4.5.4 Antibiotika	21
4.5.5 Gallesalt	21
4.5.6 Vibriostatisk	21
4.6 DYRKINGSMEDIER FOR ISOLERING AV AEROMONAS.....	22
4.6.1 Anrikningsmedium	24
4.6.2 anbefalte medier	24
5 VURDERING AV BRUKERVENNLIGHET FOR ULIKE MEDIER.....	30
6 ULIKE MEDIERS EVNE TIL SELEKTERING OG DIFFERENSIERING.....	32
7 SAMMENLIGNINGER AV MEDIER FOR ISOLASJON FRA MATVARER	34
8 KONKLUSJON	36
9 REFERANSELISTE	37

1 Innledning

Aeromonas er en bakterie som finnes i jord og sjø og som påvises i alle typer næringsmidler og vann, spesielt sjømat. Vi spiser mer rå og lite bearbeidet sjømat, og derfor kan nye mikrobiologiske utfordringer slik som *Aeromonas* som finnes i sjømat og som kan vokse i ulike atmosfærer ved kjøleskapstemperatur utgjøre en fare med tanke på forringelse og mattrygghet til produkter. Selv om *Aeromonas* kan gi sykdom ved inntak gjennom mat og vann finnes det ikke mikrobiologiske kriterier for *Aeromonas* i matvarer og vann. Det er derfor ønskelig å få mer kunnskap om vekst av *Aeromonas* med tanke på vekst i næringsmidler med hensyn til kvalitetsforringelse og mattrygghet av næringsmidler.

I denne oppgaven skal vi se på *Aeromonas* som matbåren organisme, samt hva slags dyrkingsmedier som brukes for å påvise *Aeromonas* i næringsmidler. Denne problemstillingen er omformulert fra opprinnelig problemstilling, der målet var å øke selektiviteten til mediet Stivelse Ampicillin Agar (SAA) ved hjelp av anaerob pre-inkubering for påvisning av *Aeromonas*-arter. Bakgrunnen for den opprinnelige problemstillingen stammer fra metoden for påvisning av *Aeromonas* som er utarbeidet av Nordisk Metodikkomité for næringsmidler (NMKL). Utfordringen med denne metoden er at det selektive dyrkingsmediet SAA-agar ikke er selektivt nok, og spesielt ved bruk for isolering av *Aeromonas* fra sjømat. Da isolerer man også *Pseudomonas*-arter som man ofte sliter med å skille fra *Aeromonas*-arter da bakteriene kan ligne på hverandre på agarskålene. Det har derfor blitt vurdert å bruke en metode med anaerob pre-inkubering for å øke selektiviteten til SAA-agar, fordi mange *Pseudomonas*-arter er mer følsom for anaerobe forhold enn *Aeromonas*-arter.

På grunn av corona-pandemien og stenging av campus den 12.mars ble den praktiske delen av oppgaven umulig å gjennomføre, slik at en endring av den opprinnelige eksperimentelle prosjektplanen til en teoretisk problemstilling var nødvendig. Selv om det ikke var mulig å utføre den praktiske delen, var vi fortsatt veldig interessert i å sammenligne de ulike dyrkingsmediene som brukes for å påvise *Aeromonas*-arter i næringsmidler. Det har også blitt gjort mindre forskning om *Aeromonas* som matbåren organismen sammenlignet med andre bakteriearter som for eksempel *Pseudomonas* og *Listeria*.

Denne oppgaven omfatter en litteraturstudie for å kartlegge *Aeromonas* som en matbåren organisme samt hvilke dyrkingsmedier som brukes til påvisning av *Aeromonas* fra mat. Med årene har betydningen av bakterieslekten i næringsmidler økt i takt med nye tilberedningsmetoder. Det er derfor ønskelig å standardisere metoden siden det per i dag ikke finnes en ISO-standard for påvisning av *Aeromonas* i næringsmidler.

Hovedmål

Hovedmålet med denne oppgaven var kartlegging av *Aeromonas* som en matbåren organisme og sammenligning av dyrkingsmedier som brukes til påvisning av *Aeromonas*-arter i næringsmidler.

Hovedmålet ble delt inn i flere delmål. De delmålene var følgende:

- Beskrive generelle fakta om *Aeromonas*-arter (klassifikasjon, cellestruktur, patogenitet og virulens osv.)
- *Aeromonas* i næringsmidler, hvorfor utgjør *Aeromonas* et problem innenfor næringsmiddelindustrien?
- Hva slags dyrkingsmedier brukes ved påvisning av *Aeromonas* i næringsmidler?
- Vurdere dyrkingsmedier evne til å selektere og differensiere, samt hvilke dyrkingsmedier som er mest brukervennlig

2 Introduksjon til *Aeromonas*-slekten

Aeromonas er gram-negative, ikke-sporedannende og fakultativt anaerobe staver. De er også katalase- og oksidase positive og kan fermentere glukose og mange andre karbohydrater (Sundheim, 1991). *Aeromonas* har også evne til å redusere nitrat, og kan produsere mange ekstracellulære enzymer som lipaser, proteaser, nukleaser, sulfataser, lecitinaser, chitinaser og amylaser (Perales, 2012). *Aeromonas*-slekten kan deles inn i to grupper, de ubevegelige psykrotrofe og de bevegelige mesofile. De psykrotrofe er hovedsakelig fiskepatogene artene som for eksempel *A. salmonicida* som har optimum ved temperaturer mellom 22-28 °C. De mesofile vokser best ved temperaturer mellom 35-37 °C, men mange vokser også mellom 4-42 °C. Gruppen av mesofile *Aeromonas* inneholder arter som er humanpatogene som for eksempel *A. hydrophila*, *A. caviae* og *A. veronii* biovar *sobria* som er de viktigste artene for både drikkevannindustrien og folkehelsen. *Aeromonas* befinner seg overalt i miljøet, både i vann og jord (Percival & William, 2014).

2.1 *Aeromonas* historie

Det har vært store uenigheter om taksonomien til slekten *Aeromonas* siden disse organismene ble først beskrevet på slutten av 1800-tallet. I 1891 ble *Aeromonas* klassifisert som *Bacillus hydrophilus fuscus* av professor Sanarelli. Sanarelli studerte immunitet til bakterien *Bacillus antracis* i frosk, men han oppdaget senere at mange dyr fikk blodforgiftning som ikke var forårsaket av *Bacillus antracis*. Han isolerte da den forårsakende bakterien, og kalte den *Bacillus hydrophilus fuscus* (Farmer et al., 2006). Senere ble *Aeromonas* både klassifisert som *Bacterium* og *Aerobacter*, men på grunn av identifikasjonsmetoder da var ikke så presise ble den også ofte klassifisert som *Proteus*, *Escherichia*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium* og *Vibrio*. Navnet *Aeromonas*, som betyr «gass-produserende enhet», ble brukt for første gang i 1936 av Kluyver og van Niel (Percival & William, 2014). Tabell 1 viser historiske navn til *Aeromonas*-slekten, samt når navnet ble først beskrevet.

Tabell 1: Historiske navn gitt til *Aeromonas*-slekten (Percival & William, 2014)

Navn	Årstall
<i>Bacillus punctatus</i>	1890
<i>Bacillus ranicida</i>	1890
<i>Bacillus hydrophilus fuscus</i>	1891
<i>Bacterium punctatum</i>	1891
<i>Aerobacter liquefaciens</i>	1900
<i>Bacillus hydrophilus</i> Sanarelli	1901
<i>Bacillus (Proteus, Pseudomonas, Escherichia) ichthyosmius</i>	1917
<i>Achromobacter punctatum</i>	1923
<i>Pseudomonas (Flavobacterium) fermentans</i>	1930
<i>Pseudomonas punctata</i>	1930
<i>Proteus melanovogenes</i>	1936
<i>Pseudomonas caviae</i>	1936
<i>Pseudomonas formicans</i>	1954
<i>Vibrio jamaicensis</i>	1955

Rundt 1960-tallet ble forskerne i større grad enige om definisjonen av *Aeromonas*. I 1965 ble *Aeromonas*-slekten inkludert i familien *Vibrionaceae*, men er nå klassifisert i familien *Aeromonadaceae* (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). I 1974 ble det beskrevet tre arter innen *Aeromonas* i Bergey's Manual: *A. hydrophila*, *A. punctata* og *A. salmonicida* (Farmer et al., 2006). I den nyeste versjonen (Bergey's Manual, 2005) er det beskrevet at *Aeromonas*-slekten består av 14 arter basert på DNA-DNA hybridisering. Per i dag er det 36 arter som er kjent, hvorav 19 arter er regnet som humanpatogene (Hoel et al., 2019). Tabell 2 viser de 36 ulike artene i *Aeromonas*-slekten og hvor artene er funnet.

Tabell 2: Artsoversikt for *Aeromonas*-slekten (Hoel et al., 2019)

Art	Reservoar
<i>A. allosaccharophila</i>	Ål
<i>A. aquatica</i>	Innsjø
<i>A. aquatilis</i>	Innsjø
<i>A. australiensis</i>	Vann
<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>	Akvarium vann
<i>A. diversa</i>	Menneske
<i>A. encheleia</i>	Ål
<i>A. enterica</i>	Menneske
<i>A. eurenophila</i>	Ferskvann
<i>A. finlandiensis</i>	Innsjø
<i>A. fluvialis</i>	Elv
<i>A. hydrophila</i>	Melk
<i>A. intestinalis</i>	Menneske
<i>A. jandaei</i>	Menneske
<i>A. lacus</i>	Innsjø
<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>	Vann
<i>A. salmonicida</i>	Fisk
<i>A. sanarellii</i>	Menneske
<i>A. schubertii</i>	Menneske
<i>A. simiae</i>	Ape avføring
<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

I de siste tiårene ble både DNA-DNA hybridisering og sekvensering av husholdningsgenet 16S rRNA brukt for å identifisere og klassifisere *Aeromonas*-artene. I dag er den mest presise metoden sekvensering av de proteinkodende husholdningsgenene *gyrB* (koder for B- underenheten til DNA-gyrase, en type II DNA-topoisomerase) og *rpoD* (koder for σ^70 faktoren som gir promoter-spesifikk transkripsjonsinitiering på RNA-polymerase). Denne metoden har gjort det mulig å bygge et presist fylogenetisk tre for *Aeromonas* (Hoel et al., 2019).

2.2 Morfologi og Struktur

Aeromonas er en stavformet bakterie og har en størrelse mellom 0.3-1.0 x 1.0-3.5 μm . De forekommer vanligvis alene eller i par, og noen ganger også i korte kjeder. *Aeromonas* har mange fysiske egenskaper (f.eks. flageller, piler, kapsler, S-lag, lipopolysakkarider og ytre membranproteiner) for å hjelpe deres bevegelighet og beskytte seg mot skadelige miljøer (Liu, 2015).

2.2.1 Flagell

Flageller er strukturer som fremmer bevegelse hos bakterie. Disse strukturene gjør det mulig for bakterier å flytte seg rundt i miljøer (Lowry, 2014). To typer flageller har blitt identifisert hos de bevegelige *Aeromonas*-artene, polar- og lateral flagell, som gjør det mulig for bakterie å bevege seg i vandige miljøer og faste overflater. Disse flagellene spiller også viktige roller i celleadhesjon og utholdenhet under infeksjon (Pessoa et al., 2019).

2.2.2 Pili

Pili har oppgave til å feste bakterien på slimhinne og andre faste overflater. Hos *Aeromonas* er det beskrevet to typer piler: kort ubøyelig pili (type I) og lang bøyelig pili (type IV eller mini-pili) (Liu, 2015). Type I er ikke relatert til patogeniteten hos bakterien, og de finnes oftest i *A. hydrophila*. Type IV er mer relatert til bakteriell patogenitet, og de er vanligvis tilstede i artene som *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* og *A. trota* (Pessoa et al., 2019). Tabell 3 viser forskjellige pili-typer hos *Aeromonas*, samt størrelse og masse til de ulike piliene.

Tabell 3: Pili hos *Aeromonas*-arter (Liu, 2015)

Pili	Morfologi	Diameter (nm)	Molekylær masse (kDa)	Art
Type I	Rett (ubøyelig)	9-10	17-20	<i>A. hydrophila</i>
Type IV	Bølget (bøyelig)	7	20-23	<i>A. hydrophila</i> , <i>A. veronii</i> , <i>A. caviae</i> , <i>A. trota</i>
Mini-pili	Bølget (bøyelig)	7-9	4	<i>A. hydrophila</i>

2.2.3 Kapsel

Det ytterste laget av bakteriecellen kan være dekket av en kapsel. En kapsel består av flere monosakkarider som bindes sammen ved hjelp av glykosid-bindinger. Noen *A. hydrophila* kan produsere kapsel ved oppdyrking i et glukoserikt medium (Liu, 2015). Kapsel beskytter bakterier mot vertsorganismens forsvar, som hvite blodceller, og gjør det mulig for bakterier å vokse i vertsorganismen (Henriksen et al., 2020). De fungerer også som en barriere mot hydrofobe giftstoffer, og er regnet som en virulensfaktor (Liu, 2015).

2.2.4 S-lag

S-laget er et lag av protein eller glykoprotein som dekker hele den ytre membranen til bakteriecellen. Det beskytter cellen mot organismens forsvarsmekanismer, og gjør at bakterier kan feste til vertsceller eller andre miljøoverflater og formere seg der (Liu, 2015).

2.2.5 Lipopolysakkarid

Lipopolysakkarider (LPS) finnes i den ytre membranen til bakterier, og er molekyler som består av tre enheter: lipid A, kjernepolysakkarider og O-polysakkarider (eller O-antigen) (UiO, 2011). LPS er involvert i adhesjon til epitelceller, der O-antigener gir en beskyttelse mot verts fagocytose. Frigjøring av lipid A fra lyserte bakterier kan forårsake en stor systemisk betennelse som septisk eller endotoksisk sjokk (Liu, 2015).

2.2.6 Ytre membranprotein (Omps)

Flere typer av ytre membranprotein (Omps) har blitt identifisert hos *Aeromonas*. Omps har variert størrelsene, vanligvis mellom 30-54 kDa (Lowry, 2014). De har funksjoner som osmoseregulering og næringsopptak, og de spiller også en viktig rolle i *Aeromonas* virulens (Pessoa et al., 2019).

2.3 Patogenitet og virulensfaktor

I tillegg å ha flere fysiske egenskaper som hjelper deres bevegelighet og beskytter seg mot ulike miljøforhold, kan *Aeromonas* også produsere en rekke ulike toksiner, enzymer og andre produkter som lette deres invasjon av vertsceller og unnvikelse fra vertens immunforsvar. De kan produsere toksiner og andre produkter som for eksempel cytotoksiske enterotoksiner, cytotoniske enterotoksiner, hemolysiner, proteaser og lipaser (Liu, 2015).

2.3.1 Cytotoksisk enterotoksin

Cytotoksisk enterotoksin eller cytolytisk enterotoksin er et enkeltkjedet polypeptid som har en masse på 52 kDa (Liu, 2015). Dette enterotoksinet (Act) er kodet av *act* genet, og det er relatert til aerolysin: et toksin som er produsert av noen *Aeromonas*-arter med hemolytisk, enterotoksisk og cytolytisk aktivitet (D'Sa & Harrison, 2010). Cytotoksiske toksiner kan fremme nedbrytning av tarmepitel, og de kan forårsake blodig diare hos mennesker (Pessoa m.fl. 2019). Det har også blitt oppdaget at toksinet induserer oppsamling av væske i tarmene og stimulerer inflammatoriske responser ved økt cytokinproduksjon gjennom forhøyede konsentrasjoner av tumor nekrose faktor, interleukin-1 β og interleukin-6, og spiller derfor en viktig rolle i *Aeromonas*-infeksjoner (Hoel et al., 2019).

2.3.2 Cytotonisk enterotoksin

Aeromonas-arter kan skille ut to typer cytotonisk enterotoksiner: *Aeromonas* varmestabilt cytotonisk enterotoksin (Ast), og -varmelabilt cytotonisk enterotoksin (Alt). Varmelabile cytotoniske enterotoksiner kan bli degradert ved temperatur på 56 °C i 10 minutter og reagerer ikke med cholera antitoksinet, mens varmestabile cytotonisk reagerer med cholera toksinet og degradering kan skje ved 100 °C i 30 minutter (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). Toksiner medfører ikke nedbrytning av epitelceller i tarmen, men øker de sykliske adenosin monofosfat (cAMP) nivåene og prostagladiner i tarmepitelceller som forårsaker vandig diare. Cytotoniske enterotoksiner skiller seg fra aerolysin, både biologisk og genetisk (Liu, 2015).

2.3.3 Hemolysin

Hemolysiner (eller aerolysiner) er proteiner som ødelegger røde blodcellers cellemembran og fører til lysis. Det har blitt identifisert to typer hemolysiner hos *Aeromonas*: α -hemolysiner og β -hemolysiner. Disse to typene er både fysiologisk og funksjonelt forskjellig, men begge har evne til å danne porer i membranen hos målcellen og forårsake osmotisk lysis (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). Hemolyseaktivitet kan bli påvist ved å dyrke bakteriestammene på blodagar (Pessoa et al., 2019).

2.3.4 Protease

Aeromonas produserer et stort antall av ekstracellulære proteaser som er involvert i nedbrytningen av forskjellige proteinholdige forbindelser som albumin, fibrin og geletin (Liu, 2015). Tre typer proteaser har blitt identifisert hos *Aeromonas*: metalloprotease (*ahp*, *aphB*), acetylkolinesterase og serin-protease (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). I tillegg til deres vanlige funksjoner spiller disse proteasene også en viktig rolle i å aktivere andre virulensfaktorer (Pessoa et al., 2019).

2.3.5 Lipase

Lipaser tilhører gruppen esteraser, og de fungerer som en katalysator for hydrolysering av fett. De fungerer også som virulensfaktorer ved interaksjon med humane leukocytter eller modulasjon av vertsimmunsystemer (Liu, 2015). En viktig lipase innen *Aeromonas*-arten er glycerolfosfolipid, kolesterol acyltransferaser (GCAT), som har evne til å spalte membranene til erytrocytter og produsere lysis (Fernández-Bravo & Figueras, 2020).

2.3.6 Andre virulensfaktorer

Aeromonas er en fakultativ organisme og kan overleve i ulike miljøforhold. For overlevelse og tilpasning under skadelige forhold (f.eks. lav næringstilgang, temperatur- og pH- endringer), kan den styrke og undertrykke uttrykket av visse egenskaper, noe som gjør det mulig for *Aeromonas* å vokse i forskjellige matvarer (Awan et al., 2018).

A. hydrophila har evnen til å gå inn i en VBNC-fase (viable but non-culturable). VBNC-fasen er en fase der cellene er levende men ikke dyrkbare, og har som oppgave som å beskytte bakterien mot ytre stress som forårsakes av for eksempel lav pH, endring av temperatur og osmotisk sjokk. Bakterier som er i VBNC-fasen kan gå tilbake til levedyktige tilstander når vekstvilkårene i miljøet blir bedre (Awan et al., 2018).

Aeromonas har også evnen til å danne biofilm. Biofilm består av polysakkarider, proteiner og ekstracellulært DNA som blant annet bidrar til å feste bakteriene til hverandre og til overflaten (Awan et al., 2018). Biofilmdannelse hos en matbåren organisme som *Aeromonas* øker evnen deres til å overleve i ekstreme miljøer. Deres evne til å danne biofilmer gir også dem bedre beskyttelse mot kjemikalier som brukes til desinfeksjon av utstyr i matproduksjon (Yaron & Römling, 2014). *A. hydrophila* kan danne biofilmer på både biotiske- og abiotiske overflater, for eksempel kan den danne biofilm på overflaten av salat som gjør at den blir vanskeligere å skylle bort (Efsthios et al., 2018). I tillegg kan biofilmen hos *A. hydrophila* være en kilde til sykdomsutbrudd (Awan et al., 2018).

3 *Aeromonas* i næringsmidler

Mikroorganismer kan påvirke kvaliteten og mattryggheten til næringsmidler både i en gunstig og skadelig måte. Det er spesielt denne skadelige påvirkningen som er av interesse, hvor mikroorganismene kan lede til forringelse av mat og matforgiftning. Forringelse av mat påvirker først og fremst kvaliteten, mens det er de patogene mikroorganismene som forårsaker matforgiftning. Sykdom som overføres gjennom næringsmidler og som skyldes bakterier kan deles inn i infeksjoner og intoksikasjoner (Granum, 2015; Tomar, u.å.). Sistnevnte forekommer ved inntak av toksiner som er blitt produsert av bakterier som har vokst i maten. Infeksjoner er derimot et resultat av konsumering av levende mikrober som vokser og invaderer vev, og/eller frigjør toksiner (Tomar, u.å.).

Patogene eller skadelige mikroorganismer i mat utgjør et stort problem for folkehelsen over hele verden. Det leder til mange sykdomstilfeller og dødsfall, det har dermed over årene blitt et økende fokus på matens hygiene. I Norge har det vært relativt få utbrudd og enkelttilfeller av matbåren sykdom sammenlignet med resten av verden. I USA registreres det derimot 76 millioner tilfeller per år og 5000 dødsfall. Det er funnet over 250 ulike matbårne sykdommer som forårsakes av bakterier, virus og parasitter. (Granum, 2015; Tomar, u.å.)

3.1 Forekomst

Aeromonas spp. er å finne i store deler av naturen og kan nærmest isoleres fra alle ferskvannskilder. Funn av høye nivåer av *Aeromonas*-arter i vann er ofte et resultat av fekal forurensing, samt høyere temperatur i vannkilden (Percival et al., 2014). Vann er derimot kilden til flest tilfeller av gastroenteritter forårsaket av *Aeromonas* spp. på verdensbasis. Undersøkelser foretatt i Australia, Danmark, USA, Japan, Norge og Storbritannia avdekker funn av *Aeromonas* spp. i flere ulike matvarer. Sjømat, fjørfe, kjøttprodukter og rått kjøtt, samt grønnsaker og melk er blant de matvarene som ofte er kontaminert med *Aeromonas* spp. (Granum, 2015; Liu, 2015). Tabell 4 viser eksempler på kilder hvor *Aeromonas*-isolater er funnet i Norge.

Tabell 4: Eksempler på kilder hvor *Aeromonas*-isolater er funnet i Norge (Granum, 2015, s. 60; Hoel, Vadstein & Jakobsen, 2017; Umutoni, 2019)

Art	Kilde	Enterotoksin
<i>A. hydrophila</i>	Overflatevann	+
<i>A. hydrophila</i>	Drikkevann	+
<i>A. hydrophila</i>	Bekkevann	+
<i>A. hydrophila</i>	Raspeballer	+
<i>A. hydrophila</i>	Krabbe	+
<i>A. hydrophila</i>	Breiflabb	+
<i>A. hydrophila</i>	Rakefisk	+
<i>A. hydrophila</i>	Eggemasse	+
<i>A. hydrophila</i>	Ferdigpakkede salater	Ikke nevnt i kilde
<i>A. hydrophila</i>	Sushi	Ikke nevnt i kilde
<i>A. caviae</i>	Kjøttdeig	+
<i>A. caviae</i>	Rått kjøtt	-
<i>A. caviae</i>	Regnvann	+
<i>A. caviae</i>	Rakefisk	-
<i>A. caviae</i>	Rakefisk	+
<i>A. caviae</i>	Kjøttdeig	-
<i>A. caviae</i>	Sushi	Ikke nevnt i kilde
<i>A. trota</i>	Kjøttdeig	+
<i>A. trota</i>	Krabbe	+
<i>A. trota</i>	Drikkevann	+
<i>A. shubertii</i>	Råvann	-
<i>A. vernii-like</i>	Eggemasse	+
<i>A. media</i>	Ferdigpakkede salater	Ikke nevnt i kilde
<i>A. media</i>	Sushi	Ikke nevnt i kilde
<i>A. salmonicida</i>	Ferdigpakkede salater	Ikke nevnt i kilde
<i>A. salmonicida</i>	Sushi	Ikke nevnt i kilde
<i>A. bestiarum</i>	Sushi	Ikke nevnt i kilde
<i>A. dhakensis</i>	Sushi	Ikke nevnt i kilde

I tillegg til næringsmidler har *Aeromonas* spp blitt isolert fra mennesker, fugler, husdyr, virvelløse dyr og insekter. Forekomsten av *Aeromonas*-arter er relatert til sanitære og hygieniske forhold, geografisk sted, kosthold, aldersgruppe og arter involvert (Liu, 2015). I følge Daskalov (2006) er *A. hydrophila* ofte å finne i sjømat, samt i kjøtt og fjørfe.

3.2 Vekst og overlevelse i næringsmidler

Mikroorganismers vekst i næringsmidler påvirkes av matens iboende egenskaper og parametere i det ytre miljøet. Egenskaper som knyttes til selve maten er pH, vanninnhold, næringsinnhold, innhold av antimikrobielle bestanddeler, potensial for oksidasjon-reduksjon og matens biologiske struktur. Parametere i det ytre miljøet kan påvirke både selve maten og mikroorganismene i den, de består av lagringstemperatur, tilstedeværelse av andre mikroorganismer, lagringsatmosfære og relativ fuktighet. Arter av *Aeromonas* kan vokse i mange ulike næringsmidler grunnet deres evne til å vokse i ulike atmosfærer og temperaturer, samt ved konsentrasjoner av opptil 3,5 % salt. Dette gjør at arter av *Aeromonas* kan vokse godt i vakuumpakket og kjølelageret mat (Granum, 2015; Tomar, u.å.).

En studie gjort av Jakobsen et al. (2020) viser at *A. salmonicida* vokser godt i både vakuumpakket og MAP-pakket laks ved 4 °C, men at MAP-pakket laks hadde redusert vekst sammenlignet med vakuumpakket. Ifølge Hoel et al. (2018) som utførte en studie på butikksushi vil *A. salmonicida* ved normal atmosfære vokse uhemmet ved 4 °C på laks, derimot gjorde den sure risen at laksen fikk nedsatt pH og sørget for et mindre gunstig miljø for vekst. For noen stammer er det blitt observert vekst ved svært lave temperaturer, angivelig så lavt som -0,1°C (Daskalov, 2006).

3.3 Matbårne utbrudd forårsaket av *Aeromonas*

Aeromonas spp. har potensialet til å anses som en signifikant matbåren patogen, men deres rolle er ikke fast etablert (Daskalov, 2006). En store grunn til at den eksakte forekomsten av *Aeromonas* er ukjent, foreligger at det ikke er en meldepliktig sykdom i de aller fleste land (Janda & Abbott, 2010). I Norge er det dokumentert relativt få utbrudd av matforgiftning som skyldes *Aeromonas* spp. Blant disse har ulike typer sjømat ofte vært involvert. I et tilfelle med rakefisk, hvor det ble brukt urent bekkevann ved nedlegging, ble de funnet betydelige mengder *A. hydrophila* og *A. caviae* (Granum, 2015). Tabell 5 viser rapporterte utbrudd av *Aeromonas* i Norge med antall- og matvarer involverte samt inkubasjonstid. Selv om det er rapportert få utbrudd forårsaket av *Aeromonas* i Norge er det sannsynligvis flere tilfeller av gastroenteritt som går under radaren da mange ikke oppsøker lege ved slike symptomer.

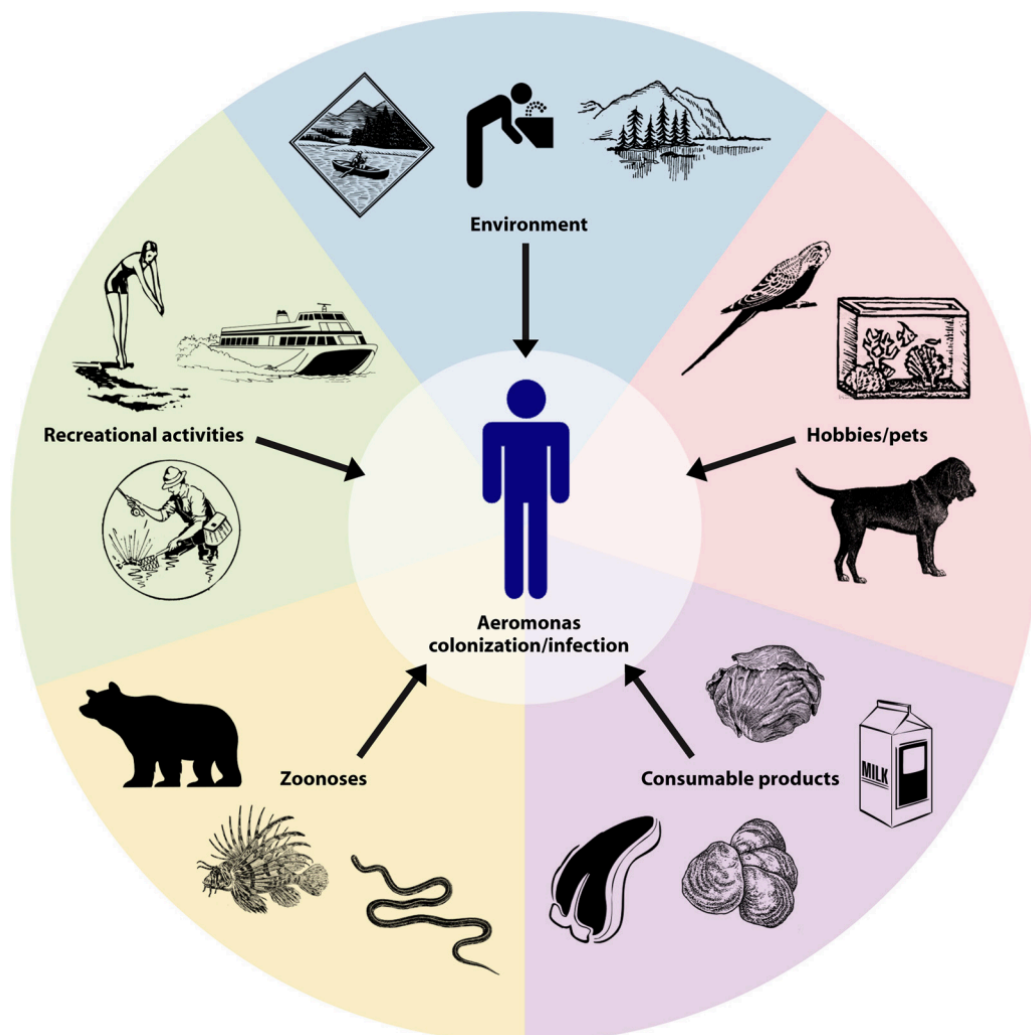
Høye antall *A. hydrophila* (10^6 - 10^7 cfu/g) ble funnet i kjøtt- og fiskeprodukter etter at det ble rapportert sykdom i et utbrudd i Sverige (Daskalov, 2006). Under et utbrudd i Kina ble det identifisert 349 sykdomstilfeller forårsaket av *A. hydrophila* hvor kilden til utbruddet var ingredienser i en salat som var vasket med kontaminert vannkilde (Zhang et al., 2012).

Tabell 5: Rapporterte utbrudd av *Aeromonas* spp. i Norge (Granum, 2015, s. 61)

Antall involverte	Inkubasjonstid i timer	Matvarer involvert
Mange	Ukjent	Fisk
Mange utbrudd	Ca. 20	Supper
1	20	Snegler
472	24-48	Østers
7	22-34	Østers
29	Ukjent	Ukjent
4	Ukjent	Sjømat
>20	< 24	Reker
3	24-36	Østers
14	< 24	Reker
2	6-8	Reker
22	20-34	Lunsjbord
3	16-48	Rakefisk

3.4 *Aeromonas* spp. og human sykdom

Innenfor slekten er det flere arter som er assosiert med diareesykdommer og sårinfeksjoner hos mennesker. De mest utsatte for sykdom er mennesker med redusert immunforsvar, samt barn under to år og voksne over 50 år (Liu, 2015; Granum, 2015). Inkubasjonstiden varierer mellom 6-48 timer. Symptomer starter gjerne med magesmerter og diare, etterfulgt av mild feber, hodepine og ved noen tilfeller oppkast. Invasive *Aeromonas*-arter kan forårsake mer alvorlige tilfeller av sykdommen, dette kan ligne på dysenteri, med blodig avføring. Sykdommen har en varighet på ett til tre døgn. Den infektive dosen for *Aeromonas* spp. i mat er vanskelig å fastsette grunnet manglende studier, men ifølge noen utbrudd sett i Norge ligger den antakelig mellom 10^6 og 10^8 (Isonhood & Drake, 2001; Granum, 2015).



Figur 1: Miljøkilder av *Aeromonas*-arter som potensielt kan føre til infeksjon eller kolonisering hos mennesker (Janda & Abbott, 2010)

Infeksjon/kolonisering med *Aeromonas*-arter hos mennesker kan skje gjennom flere ulike veier, som vist i figur 1. Studier antyder at flertallet av mesofile isolater stammer fra kontakt med kontaminert drikkevann, samt konsumering av næringsmidler som er blitt eksponert gjennom vanningsystem eller under andre produksjonssystemer. En annen mulig kilde er skjell, dersom den foreligger ved steder hvor sjøvannet den filtrerer inneholder bakterien. Det kan lede til en oppkonsentrering av *Aeromonas* i kjøttet. Mindre vanlige årsaker hvor *Aeromonas* smitte kan skje er slikt som bading og fiske, hvor vedkommende har hatt åpne sår eller fått i seg kontaminert vann gjennom luftveier (Janda & Abbott, 2010).

3.5 Behandling og forebygging

En *Aeromonas*-infeksjon behandles med antibiotika. De fleste antimikrobielle midlene som er målrettet mot gram-negative fakultativt anaerobe eller aerobe basiller kan brukes mot *Aeromonas*. Disse inkluderer cefalosporiner, kinoloner og trimetoprim-sulfametoksazol, samt tilsier en annen studie at også benzylisothiocyant, sulforaphane og 2-fenylethylisothiocyant er effektive for å hemme vekst av *Aeromonas*-arter (Liu, 2015).

Det er funnet at *Aeromonas* har hatt en økning i resistens mot antimikrobielle stoffer, dette er blitt sett i både kliniske prøver, vann og næringsmidler. Økningen av resistente *A. hydrophila* stammer er sett på som en konsekvens av omfattende bruk av antimikrobielle stoffer for behandling av mennesker og fisk. I tillegg spres resistens blant matbårne patogener, hvor det er blitt brukt antimikrobielle stoffer for behandling av husdyr. Resistens genene finnes i mobile genetiske elementer og kan overføres blant bakterier gjennom transformasjon, transduksjon og konjugasjon (Strarev & Odeyemi, 2016).

4 Dyrkingsmedier

For å dyrke mikroorganismer i et laboratorium behøver de tilgang til næringsstoffer, og dette får de gjennom dyrking i kulturmedier. Mikroorganismers næringskrav er svært variert og for en suksessfull oppdyrking kreves det kunnskap om mikroorganismers næringskrav.

Sammensetningen av næringsstoffer varierer for organismene, men noe som også varierer er mengden av næringsstoffer. Næringsstoffer som behøves i store mengder kalles for *makronæringsstoffer*, mens *mikronæringsstoffer* kreves i mindre mengder. Mikroorganismer bruker disse forbindelsene for å produsere energi til å vedlikeholde og dannelse av nye celler. (Madigan et al., 2014; Mohanta, Goel & Dutta, 2017)

4.1 Makronæringsstoffer og mikronæringsstoffer

Alle celler trenger karbon og en celles tørrvekt består av rundt 50 % karbon. De fleste prokaryote skaffer karbon fra blant annet aminosyrer, sukker, fettsyrer, og nitrogenbaser, mens autotrofe mikroorganismer får fra karbondioksid (CO_2). Nitrogen finnes i mange av cellens bestanddeler, mengden nitrogen i en celle er omtrent 13%. Nitrogen kan tas opp som ammoniakk (NH_3), nitrat (NO_3^-) og nitrogengass (N_2). N_2 kan kun tas opp av nitrogenfikserende bakterier. (Madigan et al., 2014; Mohanta, Goel & Dutta, 2017)

Mikroorganismer trenger flere sporstoffer for å vokse, men i mindre mengde enn makronæringsstoffene. Jern (Fe) er et svært viktig metall for cellens respirasjonssystem. Sporstoffer fungerer ofte som kofaktor til enzymer. (Madigan et al., 2014; Mohanta, Goel & Dutta, 2017)

4.2 Typer dyrkingsmedier

Dyrkingsmedier kan deles inn i to klasser, definerte og komplekse medier. Forskjellen mellom disse er at definerte mediers nøyaktige sammensetning er kjent mens komplekse mediers sammensetning er ikke kjent nøyaktig. Definerte medier lages ved at presise mengder av uorganiske og organiske kjemikalier tilsettes i destillert vann. Komplekse medier brukes gjerne til dyrking av mange mikroorganismer og er inneholder biologiske materialer som blant annet soyaekstrakt, kjøtt ekstrakt, gjærekstrakt eller kasein. Anrikede medier er komplekse medier som er tilsatt annen næringsrike komponenter som serum eller blod. Dette brukes til å dyrke mikroorganismer som er krevende ernæringsmessig. Dyrkingsmedier brukes i tillegg for å selektere og differensiere bakterier fra hverandre. Et selektivt medium bruker komponenter som inhiberer vekst av ønsket mikroorganismer. Differensielle medier bruker en indikator, gjerne ett fargestoff, for å skille bakterier fra hverandre ved en fargeendring. (Madigan et al., 2014)

Før inokulering må dyrkingsmedier steriliseres slik at de er fri for alle livsformer, dette utføres kan gjøres i en autoklav. Inokulering gjøres i et flytende eller fast medium. Det faste mediet gjør det mulig for celler å vokse og forme synlige kolonier. Disse varierer i størrelse og form avhengig av organismen, samt næringstilgang, forholdene i kulturen og andre fysiologiske parametere. (Madigan et al., 2014)

4.3 Vekstforhold

4.3.1 Inkubasjonstemperatur

Slekten *Aeromonas* kan vokse over et bredt temperaturområde, fra 0 - 45 °C, men de fleste mesofile stammer vokser mellom 10-42 °C. Den optimale temperaturen for vekst er mellom 22-37 °C avhengig av stammen. Valg av inkuberingstemperatur avhenger av hvilke prøver som skal analyseres, kliniske isolater bruker gjerne 37 °C, mens miljøisolater ofte inkuberes ved 22-30°C. I noen studier har inkubering ved 37 °C vist seg å produsere mer isolater enn ved 28 °C. Noen psykrofile stammer av *A. salmonicida* vokser i temperaturområdet 2- 30 °C. (Carnahan & Joseph, 2005; Perales, 2012)

4.3.2 Atmosfære

Aeromonas-arter er fakultativt anaerobe, men blir vanligvis inkubert med oksygen tilstede. I en studie av Cunliffe og Adcock (1989) ble vannprøver inkubert anaerobt i 18 timer ved 30 °C etterfulgt av inkubering aerobt i 24 timer ved 35 °C. Studiet viste at vekst av bakgrunnsfloraen ble redusert og forbedret konfirmering grad av presumptive *Aeromonas spp.* (Perales, 2012)

4.4 Differensierings komponenter

4.4.1 Karbohydrat

I noen medier brukes karbohydrater for å differensiere *Aeromonas* fra bakgrunnsflora. De fleste *Aeromonas spp.* er laktose negative, men der er noen unntak hvor de har evne til å utvikle laktosefermentering. I noen medier brukes det fermenterbare karbohydrat og en pH indikator for å oppdage syreproduksjon, deriblant brukes det mannitol, maltose, dextrin, trehalose og glykogen. På andre siden brukes det også ikke-fermenterbare karbohydrater spesielt av hensyn til å utføre oksidasetest direkte på skålen. De vanligste karbohydratene er xylose og myo-inositol. I tillegg blir stivelse i brukt i konsentrasjoner mellom 10-20 g/L, nettopp fordi *Aeromonas* er amylase positiv. For å påvise amylase aktivitet helles det over Lugol's ioneløsning som fører til en svart farget mediet med en klar sone rundt positive kolonier. (Nordic-Committee-on-Food-Analysis, 2004; Perales, 2012)

4.4.2 b-Hemolyse

I slekten *Aeromonas* har de fleste evne til b-hemolyse på blod av sau og hest, men noen mangler denne evnen. *Aeromonas caviae* er blant de som er b-hemolyse negativ, dette kan brukes til å skille mellom andre arter som *A. hydrophila* (positiv) (Pandey, Naik & Dubey, 2010). Bruken av blod i medier anvendes spesielt med kliniske prøver. Siden blodagarer ikke inneholder karbohydrater kan oksidasetest gjøre direkte (Perales, 2012).

4.4.3 DNA

Ved å tilsette toluidinblå kan DNase-aktivitet detekteres. Dette vil være synlig som en lysrosa sone rundt koloniene (Perales, 2012).

4.4.4 Tween 80

Dette er en overflate-aktiv komponent som hydrolyseres av *Aeromonas*. På agaren vil positive kolonier ha ett område av bunnfall rundt dem (Perales, 2012).

4.5 Selektivmidler

4.5.1 Antimikrobiell

Irgasan er en antimikrobiell struktur som brukes iblant annet CIN (cefsulodin Irgasan novobiocin agar) og BSIBG (Bile Salt Irgasan Brilliant Green agar). Den kan inhibere vekst av noen gram-negative bakterier og har blitt tilsatt ved konsentrasjonene 4-5 mg (Himedia, 2011). Etanol er et annet antiseptisk produkt som ble tilsatt for å inhibere vekst av *Klebsiella* spp. (Perales, 2012)

4.5.2 Surfaktant

Ved konsentrasjoner mellom 0,1 og 0,8 g/L er det vist at sodium lauryl sulfat tilsatt i medier kan inhibere vekst av gram-positive bakterier (Hardy Diagnostics, 1996; Perales, 2012).

4.5.3 Fargestoff

For å inhibere vekst av gram-positive bakterier brukes fargestoffet fuksin sammen med natriumsulfitt. Et annet fargestoff som er aktiv mot gram-positive bakterier er krystallfiolett. I mange medier som brukes til påvisning av *Enterobacteriaceae* tilsettes brilliant grønn. Toluidinblått brukes i differensielle medier for å vise *Aeromonas* spp. DNase aktivitet. (Sumbali & Mehrotra, 2009; Perales, 2012)

4.5.4 Antibiotika

Det mest brukte antibiotikumet i dyrkingsmedier for isolering av *Aeromonas* spp. er ampicillin. Konsentrasjonen av ampicillin er generelt mellom 10 og 30 mg. Et annet antibiotikum som ble brukt før ampicillin er penicillin. Dette er lite brukt på grunn av at den er svært smalspektret. En studie viser at ved å kombinere disse antibiotikaene muligens er effektiv mot *Pseudomonas* spp. Novobiocin brukes i noen medier ved konsentrasjoner mellom 2,5 og 5 mg. Noen *Enterobacteriaceae* er sensitive for dette antibiotikumet, mens *Aeromonas* er resistent. (Perales, 2012)

4.5.5 Gallesalt

Gallesalter brukes i noen medier for å inhibere vekst av gram-positive bakterier, samt noen gram-negative ved høyere konsentrasjoner (Sigma Aldrich, u.å.). Konsentrasjonen av gallesalter i medier bruker å være mellom 1 til 8,5 g/L (Perales, 2012).

4.5.6 Vibriostatisk

Noen arter av slekten *Vibrio* kan være tilstede i prøver og forstyrre påvisningen av *Aeromonas*. Ved å tilsette sammensetningen O/129 kan man inhibere veksten deres. Noen mener at en konsentrasjon på 50 mg vil være egnet. En annen metode brukt for samme formål er å fjerne NaCl i mediet (Perales, 2012).

4.6 Dyrkingsmedier for isolering av *Aeromonas*

Det er foreslått omtrent 30 ulike medier for isolering av *Aeromonas* fra faeces, næringsmidler og vann (tabell 6). De fleste mediene baserer seg på seleksjon gjennom å tilsette gallsalter og ulike antibiotikum. For differensiering tas det ofte i bruk forskjellige karbohydrater og pH-indikatorer. Stivelse Ampicillin Agar (SAA) er et av de mest brukte mediene for detektering av *Aeromonas* spp. Stivelse og ampicillin tilsettes en fenolrød agar base. Kolonier av *Aeromonas* spp vil være gule til honningfarget. Dyrkingsmediet Ryan er utarbeidet fra et annet mediet kalt XLD. Det inneholder 5 mg/L ampicillin og arter av *Aeromonas* danner mørkgrønne og ugjennomsiktige kolonier. To andre medier som er modifisert er MacConkey xylose agar (MXA) og MacConkey mannitol agar (MMA), hvor det er tilsatt xylose og mannitol til MacConkey agar. For å øke selektiviteten i mediene tilsettes det ampicillin. Utseende til kolonier av *Aeromonas* spp. vil være røde på MMA og fargeløs på MXA etter inkubering ved 28°C i 18-24 timer. (Perales, 2012)

Glutamate Starch Penicillin agar (GSP) inneholder selektivetskomponenten penicillin, samt stivelse og pH-indikatoren fenolrødt. Etter inkubasjon i 2-3 dager ved 25 °C vil kolonier av *Aeromonas* spp. vises som gule kolonier omgitt av en klar sone, dette gjør det enkelt å skille fra bakgrunnsflora. (Perales, 2012)

Et annet medie inneholder glykogen og bromtymolblått for differensiering og natriumlauretsulfat for selektivisering. Dette kalles pepton beef extract glykogen agar (PGB) som inkuberes ved 37 °C i 24 timer og viser gule kolonier ved vekst av *Aeromonas*. Blood agar ampicillin (BAA) bruker b-Hemolyse og ampicillin for å differensiere og selektere *Aeromonas* spp. fra andre. (Perales, 2012)

Ampicillin Dextrin Agar (ADA) bruker dextrin og bromtymolblått for differensiering og ampicillin gir selektivitet. Etter inkubasjon i 24 timer ved 30°C produserer *Aeromonas* gule kolonier. Bile Salts Irgasan Brilliant Green agar (BSIBG) inneholder Irgasan, gallsalter og brilliant grønn, samt xylose som dens differensiering og selektivisering. *Aeromonas*-arter lager transparente kolonier etter inkubering i 24 timer ved 37°C (Perales, 2012). Tabell 6 viser de ulike selektive mediene for isolering av *Aeromonas* samt formål og differensierings- og selektivets komponenter som finnes i de ulike mediene.

Tabell 6: Dyrkingsmedier for isolering av *Aeromonas* spp. (Perales, 2012)

Medium	Purpose	Diagnostic system	Selective system
Ampicillin dextrin agar (ADA)	Water	Dextrin, bromothymol blue	Ampicillin, sodium deoxycholate (O/129 for sea water)
Bile salts brilliant green (BBG)	Faeces	Oxidase on the plate	Bile salts, brilliant green
Bile salts brilliant green starch agar (BBGS)	Food and water	Starch + Lugol's iodine solution	Bile salts, brilliant green
Bile salts Irgasan brilliant green agar (BSIBG)	Faeces	Xylose, neutral red, sodium thiosulfate	Bile salts, Irgasan, brilliant green
Blood agar ampicillin (BAA)	Faeces	Erythrocytes	Ampicillin
Cefsulodin Irgasan agars (CIN I & CIN II)	Faeces	Mannitol	Cefsulodin, Irgasan, novobiocin, bile salts, crystal violet
Dextrin fuchsin sulfite (DFS)	Water	Dextrin, bromothymol blue	Sodium sulfite, fuchsin
DNase ampicillin (DNDA)	Faeces	DNA, toluidine blue	Ampicillin, toluidine blue
Glutamate starch penicillin (GSP)	Water	Starch, phenol red	Penicillin
Inositol brilliant green bile salts agar (IBB)	Faeces	Inositol	Brilliant green, bile salts
Membrane filter method for <i>A. hydrophila</i> (mA)	Vann	Trehalose	Sodium deoxycholate, ethanol, ampicillin
Modified bile salts Irgasan brilliant green agar (mBSIBG)	Food	Starch, neutral red, sodium thiosulfate	Bile salts, Irgasan, brilliant green, pH 8.7
MacConkey mannitol ampicillin (MMA)	Food	Mannitol	Bile salts, ampicillin
MacConkey trehalose (non-lactose) (MT)	Water	Trehalose	Bile salts, crystal violet
MacConkey xylose ampicillin (MXA)	Food	Xylose	Bile salts, ampicillin
MacConkey ampicillin (MA)	Faeces	Lactose	Bile salts, ampicillin
MacConkey Tween 80 ampicillin (MAT)	Faeces	Lactose, Tween 80	Bile salts, crystal violet, ampicillin
MIX agar	Water	Xylose, meso-inositol, bromothymol	Blue bile salts, ampicillin
Pectin agar (PA)	Food	Pectin (polygalacturonic acid)	
Peptone beef extract glycogen (PBG)	Multipurpose	Glycogen, bromothymol blue	Sodium lauryl sulfate
Pril xylose ampicillin (PXA)	Faeces	Xylose, phenol red	Pril, ampicillin
Rimler-Shotts (RS)	Multipurpose	Lysine, ornithine, maltose, bromothymol blue, sodium thiosulfate, ferric ammonium	Citrate sodium deoxycholate, novobiocin
Ryan	Multipurpose	Lysine, arginine, inositol, lactose, sorbose, xylose, ferric ammonium citrate þ sodium thiosulfate, bromothymol blue	Bile salts, ampicillin
Salt starch xylose lysine deoxycholate (SSXLD)	Faeces	Lysine, starch, xylose	Sodium deoxycholate, citrate, NaCl
SGAP-10C	Water	Soluble starch, phenol red	Sodium G penicillin, ampicillin
Starch bile salts agar (SB)	Clinical	Starch	Bile salts
Starch ampicillin agar (SAA)	Food	Starch + Lugol's iodine solution, phenol red	Ampicillin
Xylose ampicillin agar (XAA)	Water	Xylose, phenol red	Sodium lauryl sulfate, ampicillin
Xylose sodium deoxycholate citrate (XDC)	Faeces	Xylose, neutral red, sodium thiosulfate, ferric ammonium	Citrate sodium deoxycholate, sodium citrate

4.6.1 Anrikningsmedium

En anrikningsbuljong brukes dersom det antas at cellene er skadet eller at de er i svært liten mengde. Buljongen kan tilsettes og homogeniseres sammen med en 25 g matprøve, og inkuberes. Ved å bruke MPN (most probable number)-metoden kan prøven kvantifiseres. Trypticase Soy Broth Ampicillin er utviklet for anrikning av *A. hydrophila* og tilsatt 30 mg/L ampicillin. Alkaline Peptone Water (APW) er blitt brukt sammen med en rekke ulike næringsmidler ved inkubasjon i 18-24 timer ved 28 °C. Andre har fått gode resultater ved å inkubere i romtemperatur istedenfor 37 °C i 24 timer. (Perales, 2012)

4.6.2 Anbefalte medier

For øyeblikket finnes det ingen ISO-standard for isolering av *Aeromonas* spp fra mat. Det amerikanske forbundet APHA (American Public Health Association) anbefaler å bruke dyrkingsmediet SAA, hvor inkubering av skålene foregår ved 28 °C i 24 timer. For anrikning foreslår de å bruke APW og TSBA, ved inkubering i 24 timer ved 28 °C. Som dyrkingsmedie foreslår den Nordiske Metodikkomitee for næringsmidler (NMKL) å bruke SAA, ved inkubering i 24 timer ved 37 °C. Den tidligere folkehelse laboratorietjenesten i Storbritannia anbefaler å bruke dyrkingsmediene BSIBG eller Ryan, samt APW som anrikningmedie, men har ingen nasjonal standard for isolering av *Aeromonas* i mat. (Perales, 2012)

4.6.2.1 Stivelse Ampicillin Agar (SAA)

Mediet er utviklet for isolering av *Aeromonas* spp. fra næringsmidler. I mediet er det tilsatt et antibiotikum kalt ampicillin, dette utgjør er den selektive komponenten. Differensiering av kolonier på SAA detekteres av pH-indikatoren fenolrød. Dette forekommer gjennom stivelse fermentering hvor den under syredannelse er gul og basedannelse er rød. Mediet har en rød til oransje farge, med en pH på 7,4. Uten den selektive komponenten har mediet en holdbarhet på 3 måneder ved 5-3 °C og 7 dager ved 5-3 °C dersom ampicillin er tilsatt. Inkubering av skåler foregår ved 37 ± 1 °C i 24 ± 3 timer. Kolonier som er gule eller honningfarget med en diameter på 2-3 mm og er omringet av en lys sone anses som presumptive *Aeromonas* spp. *Aeromonas* spp. kan eventuelt verifiseres ved å tilsette noen få ml Lugols jodvæske til hver skål, koloniene vil omringes av en klar sone av hydrolysert stivelse mot en mørk bakgrunn. Jod er dødelig for cellene, koloniene må derfor plukkes raskt (Nordic-Committee-on-Food-Analysis, 2004; Janet, Gordon & Rosamond, 2012). Fullstendig sammensetning av mediet viser i tabell 7.

Tabell 7: *Sammensetning av mediet*

SAA Komposisjon g/L	
Pepton	10.0 g
Kjøtt ekstrakt	1.0 g
Natriumklorid	5.0 g
Stivelse (oppløselig)	10.0 g
Fenolrødt	25.0 mg
Ampicillin	10.0 mg
Destillert vann	1000.0 ml
Agar	15.0 g

4.6.2.2 *Aeromonas* Medium Base (RYAN)

Ryan er et selektivt medium for isolering av *Aeromonas* fra kliniske og miljø prøver. Mediet er en modifisert versjon av Xylose Lysine Deoxycholate agar (XLD) som støtter vekst av *Aeromonas* spp. og *Plesiomonas* spp. i tillegg til *Enterobacteriaceae*. For å øke selektiviteten anbefaler produsenten å tilsette 5 mg/L ampicillin. Mediet brukes til påvisning av *Aeromonas* spp. i vann og en mengde ulike næringsmidler. Det ferdige mediet har en grønn farge, en holdbarhet på 5 dager ved 2-8°C og en pH på 8,0. Inkubering foregår ved 30-35°C i 24 timer. Kolonier av *Aeromonas* spp. vil ha en mørk grønn farge med et mørkt senter og en diameter på 0,5-1,5 mm (Oxoid, 2020a). Tabell 8 viser fullstendig sammensetning av Ryan.

Tabell 8: Sammensetning av mediet

RYAN Komposisjon g/L	
Proteose pepton	5.0 g
L. Lysin monohydroklorid	3.5 g
L. Arginin monohydroklorid	2.0 g
Gjær ekstrakt	3.0 g
Sorbitol	3.0 g
Xylose	3.75 g
Laktose	1.5 g
Inositol	2.5 g
Agar	12.5 g
Gallesalter Nr.3	3.0 g
Natriumklorid	5.0 g
Natriumtiosulfat	10.67 g
Bromtymolblått	0.04 g
Tymolblått	0.04 g
Ammoniumferriksitrat	0.8 g
Destillert vann	1000 ml
Ampicillin	5.0 mg

4.6.2.3 BSIBG (Bile Salts Irgasan Brilliant Green agar)

Dette er et selektivt medium for isolering av *Aeromonas* spp. fra næringsmidler, men var opprinnelig brukt til analysering av faeces. Det inneholder gallesalt og brilliant grønn som inhiberer vekst av gram-positive bakterier, samt irgasan som inhiberer vekst av gram-negative bakterier med type A nitratase. Videre differensieres evne til å fermentere xylose, hvilket *Aeromonas* spp. mangler. Kolonier som ikke produserer syre kan dermed oksidasetestes. Mesofile *Aeromonas* spp. vil vises som transparente kolonier på 1-2 mm. Mediet har en lilla farge og en pH på 7,0. Inkubering foregår ved 35-37 °C i 18-24 timer (Himedia, 2011; Janet, Gordon & Rosamond, 2012). Fullstendig sammensetning av BSIBG viser i tabell 9.

Tabell 9: Sammensetning av mediet

BSIBG Komposisjon g/L	
Kjøtt ekstrakt	5.0 g
Proteose pepton	5.0 g
D-Xylosec	10.0 g
Gallesalter	8.5 g
2,3,40 -Trichloro-20 - hydroxydiphenyl ether	0.005 g
Natriumtiosulfat	5.44 g
Brilliant grønn	0.005 g
Fenolrød	0.025 g
Agar	11.5 g
Destillert vann	1000 ml

4.6.2.4 Trypticase Soy Broth Ampicillin (TSBA)

Tryptic Soy Broth er et generelt medium som brukes for å dyrke ulike bakterier, men hvis tilsatt ampicillin (en selektiv komponent) kan det brukes for isolering av *Aeromonas*. Mediet har en gulaktig farge og en holdbarhet opp til 6 måneder ved 4-8 °C uten tilsetning av ampicillin (Dalynn, 2014). Inkubering foregår ved 30 °C i 24 timer ved påvisning av *Aeromonas* i næringsmidler. Mediet kan også inkuberes ved temperatur på 37 °C i 16 timer, og ved vekst av *Aeromonas* vil mediet bli grumsete (Perales, 2012). Fullstendig sammensetning av mediet viser i tabell 10.

Tabell 10: Sammensetning av mediet

TSBA Komposisjon g/L	
Trypton	17.0 g
Soya	3.0 g
Natriumklorid	5.0 g
Dikaliumfosfat	2.5 g
Glukose	2.5 g
Ampicillin	30.0 mg
Destillert vann	1000 ml

4.6.2.5 Alkaline Peptone Water (APW)

APW er et anrikningsmedium for isolering av *Vibrio*-arter fra næringsmidler og klinisk prøver, men mediet kan også bruke til påvisning av *Aeromonas*. Det ferdige mediet har klar lys gulfarget, en holdbarhet opp til en måned ved 15-25 °C og pH på 8,4± 0,2 (Oxoid, 2020b). Inkubering kan skje ved 37 °C i 18-24 timer, men inkubering ved romtemperatur gir et bedre resultat. Mange inkuberer også mediet ved temperatur på 28 °C (Perales, 2012). Mediet vil bli grumsete ved positiv påvisning av *Aeromonas* (Oxoid, 2020b). Tabell 11 viser fullstendig sammensetning av APW.

Tabell 11: Sammensetning av mediet

APW Komposisjon g/L	
Pepton	10.0 g
Natriumklorid	20.0 g
Destillert vann	1000 ml

5 Vurdering av brukervennlighet for ulike medier

I dette kapittelet skal vi vurdere brukervennlighet til de ulike mediene, og vil se på faktorer som holdbarhet, inkubasjonstid og -temperatur samt komponenter i ulike medier. Vurdering av disse faktorene kan gjøre det lettere å velge hvilket medium man skal bruke for å påvise *Aeromonas*. Det finnes mange medier som brukes for å påvise *Aeromonas* i næringsmidler, men det er valgt å sammenligne SAA, Ryan og BSIBG samt APW og TSBA (anrikningsmedier) fordi disse mediene er anbefalt å bruke ved påvisning av *Aeromonas* av blant annet NMKL og folkehelse laboratorietjenesten i Storbritannia.

Holdbarhet er for mange er en viktig faktor da det går mye tid til å lage medier. Hvis medier har lang holdbarhet, vil man slippe å bruke mye tid på å lage dem og undersøkelsen kan gå fortere. Alle de selektive mediene er ganske like når det gjelder holdbarhet, men Ryan-agar har kortere holdbarhet (5 dager) enn de andre mediene som brukes for å påvise *Aeromonas*-arter. Dette kan være en ulempe dersom man trenger å arbeide med akkurat dette mediet over en lengre periode. Ryan-agar kan da ikke lages som store mengder på en gang, hvert fall hvis man er usikker på hvor mange agarskåler man trenger til et eksperiment. Hvis man lager for store mengder av disse agarne kan man risikere at de gå ut på dato og måtte kaste dem, noe som kan føre til store omkostninger.

SAA-agar er også av dem som har kort holdbarhet (7 dager) på grunn av komponenten ampicillin. Uten tilsetning av ampicillin kan SAA-agar oppbevares til 3 måneder, men uten ampicillin vil ikke mediet være selektiv. Mange andre bakterier kan da vokse på agaren, og i noen tilfeller dominerer vekst av *Aeromonas*-arter. Ampicillin må derfor være tilstede for at agaren skal være selektiv.

BSIBG-agar har lengst holdbarhet (1-4 uke) sammenlignet med de to andre agarne som er nevnt tidligere, og dette skyldes at det ikke er tilsatt av ampicillin eller andre antibiotikum i mediet. Det er tilsatt andre komponenter som for eksempel gallesalt og brilliant grønn som gjør at mediet er selektivt. En ulempe med akkurat dette mediet er at uten ampicillin kan det føre til at en del ampicillin-sensitive stammer vokser på mediet.

Inkuberingstemperatur kan variere alt etter hvilke prøver som skal analyseres, men det er mest vanlig å bruke 37 °C. Alle de selektive mediene som nevnt ovenfor kan inkubere ved temperatur mellom 30-37 °C i 24 timer.

Hvis det antas at det er svært små mengde celler i prøven eller skadde celler kan et anrikningsmedium være et bedre valg. Det er nevnt tidligere i oppgaven at for anrikning så anbefaler det amerikanske forbundet APHA å bruke APW og TSBA. Uten ampicillin kan TSBA oppbevares opp til 6 måneder, mens APW har en holdbarhet på en måned. Hvis man vurderes hvilket medium man skal bruke ut ifra holdbarheten, så kan det være bedre å velge TSBA. Ampicillin vil kanskje gjøre at holdbarheten til mediet avtar, men man trenger ikke å tilsette ampicillin i mediet før det skal brukes. Inkubasjonsbetingelser til disse to mediene er ganske like, og hvis man skal vurdere ut ifra denne faktoren så har det ikke noe å si hvilket medium man velger.

6 Ulike mediers evne til selektering og differensiering

Medier har ulik evne til å selektere og differensiere, men noen klarer kanskje å selektere bedre enn andre. Her skal vi se nærmere på hvordan ulike komponenter som er tilsatt i mediene kan øke selektiviteten og hindre vekst av uønskede mikroorganismer, samt hvordan disse kan brukes til å skille ulike arter fra hverandre.

SAA-agar inneholder antibiotikum ampicillin som er en selektiv komponent. Det er tilsatt ampicillin (10 mg/L) i mediet for å hemme vekst av andre bakterier som for eksempel koliforme. Mange arter innen *Aeromonas* er resistent mot ampicillin, men en del arter som *A. sobria* og *A. caviae* blir hemmet av dette antibiotikumet og dette kan skyldes for høy konsentrasjonen av ampicillin i mediet. Mange bruker derfor lavere konsentrasjoner for å hindre at man hemmer vekst av noen *Aeromonas*-arter (Perales, 2012). Ryan-agar inneholder både ampicillin (5 mg/L) og gallesalter. Gallesalter brukes for å hindre vekst av gram-positive bakterier, og noen gram-negative bakterier ved høyere konsentrasjoner. Ut ifra dette kan man se at Ryan inneholder flere selektive komponenter enn SAA, og kan være mer selektiv basert fra komponenter som finnes i mediet. Ved påvisning av *Aeromonas*-arter er Ryan kanskje et bedre alternativ.

BSIBG-agar inneholder selektive komponenter som gallesalter og brilliant grønn. Brilliant grønn har ganske lik funksjon som gallesalter, der den brukes for å hemme vekst av gram-positive bakterier. BSIBG inneholder ikke ampicillin, og dette kan føre til at en del ampicillin-sensitive stammer vokser på mediet. Basert på komponenter som finnes i de ulike mediene, virker det nesten bedre å velge enten SAA eller Ryan for å påvise *Aeromonas*.

For å skille ulike arter inneholder medier komponenter som gjør dette enklere. Ryan inneholder en rekke differensieringskomponenter blant annet karbohydratene xylose, inositol, laktose og sorbitol. Ammonium Ferriksitrat fungerer som en indikator på H₂S produksjon, hvor positive kolonier vil ha ett svart senter, og indikatorene bromtymolblått og tymol blå som ved dannelse av syre vil endre farge til gul (Condalab, 2019). Produsenten beskriver at typiske *Aeromonas* kolonier har en mørk grønn farge med et mørkt senter og en diameter på 0,5-1,5 mm, mens andre arter blant annet *Pseudomonas* vil ha blå/grå gjennomsiktige kolonier med en diameter opp til 0,25 (Oxoid, 2020a).

Mediet SAA som inneholder stivelse og fenolrødt som del av sitt differensierings system. Kolonier som regnes som presumptive *Aeromonas* er gule eller honningfarget, omgitt av en lys sone og har en diameter på 2-3 mm. *Aeromonas* er amylase-positiv og ved å helle over Lugols væske vil de positive koloniene vises med en klar sone av hydrolysert stivelse mot en mørk bakgrunn (Nordic-Committee-on-Food-Analysis, 2004).

BSIBG inneholder i likhet med Ryan karbohydratet xylose. Siden *Aeromonas* mangler evne til fermentere xylose vil det være mulig å utføre oksidasetest direkte på mediet. I tillegg til xylose, inneholder BSIBG indikatoren fenolrødt. Kolonier av *Aeromonas* vil vises som transparente med en diameter på 1-2 mm, mens andre arter er lilla/grønne ugjennomsiktige kolonier, ofte omgitt av en sone med utfelt gallesalter (Janet, Gordon & Rosamond, 2012).

7 Sammenligninger av medier for isolasjon fra matvarer

Det finnes mange forskjellig selektive medier for isolering av *Aeromonas* spp. fra mat og vann, men ingen har fått en generell godkjenning (Latif-Eugenín et al., 2016). Mange har derfor gjort en sammenligning av ulike medier for å se hvilke medier som har god selektivitets- og differensierings evnen. Her skal vi se på hva andre har gjort, og diskuterer litt om hvilke medier som kan være mest aktuelle for isolering av *Aeromonas* fra næringsmidler.

Fricker og Tompsett (1989) har testet 563 prøver av forskjellig matvarer til å sammenligne tre selektive medier: MacConkey, BAA (med 10 mg/L ampicillin) og BSIBG. Prøver (10 g) ble anrikede i APW og inkubert ved 37 °C i 24 timer. Deretter ble prøver spredt på de tre mediene og inkubert ved 37 °C i 24 timer. Resultater viste at BSIBG var det mest effektive mediet med 48 % av prøvene positive, mens BAA viste at 43.3 % av prøvene var positive og MacConkey 31.2 %. MacConkey agarskålene ble ofte overgrodd med *Enterobacteriaceae* og BAA agarskålene ble overgrodd med *Proteus* spp.

Ribas et al. (1991) har sammenlignet fire selektive medier for isolering av *Aeromonas* fra vann. Et utvalg av 48 prøver ble tatt fra moderat forurenset elvevann, høyt forurenset elvevann og behandlings-/distribusjon vann. De selektive mediene som ble sammenlignet var ADA, mA, SAA og SGAP-10P, og resultater var likt på alle mediene men basert fra komponenter og selektivitet anbefaler forfatter det siste mediet for isolering av *Aeromonas*.

Gorbat og Jemmi (1995) har evaluert sju selektive agar medier og to anrikningsmedier for isolering av mesofile *Aeromonas*-arter. De brukte 32 renkulturer av *Aeromonas*, kunstig kontaminert mat og naturlig kontaminert kjøtt, fisk og skalldyr prøver. De anrikningsmediene som ble evaluert var APW og TSBA (med 10 mg/L ampicillin), og APW ga bedre resultater enn TSBA. Begge anrikningsmediene ble inkubert ved temperatur på 28 °C og 35 °C, men inkubering på 28 °C ga bedre resultater. De selektive agarne CIN II, BSIBG, Stivelse Ampicillin DNA-agar, Ryan og BAA (med 10, 20 eller 30 mg/L ampicillin) ble inkubert på 35 °C i 18-24 timer, og blant disse var BSIBG det mest selektive mediet, men hemmet vekst av noen *A. caviae* stammer. De brukte anrikningsmediet APW og BSIBG og BAA (med 30 mg/L ampicillin) for å isolere *Aeromonas* fra den naturlig kontaminerte mat. BSIBG påvist mer av *A. veronii* biovar sobria og BAA mer av *A. caviae* stammer. Gorbat og Jemmi anbefaler å bruke mer enn en agar for optimal utvinning av mesofile *Aeromonas*.

Tsai og Chen (1996) har sammenlignet tre selektive medier, Ryan, SAA og BAA (med 10 mg/L ampicillin) for isolering av *A. hydrophila* fra sjømat. SAA ble inkubert ved temperatur på 28 °C, men inkubering av Ryan og BAA skjedde på 35 °C. BAA ga den høyeste utvinningsgraden av *A. hydrophila*. SAA og Ryan ga lavere deteksjonsgrader enn BAA, og dette kan skyldes at arbeiderne kun leta bare etter *A. hydrophila* og andre arter som *A. caviae* og *A. veronii* biovar *sobria* kunne ha dominert veksten av *A. hydrophila*.

Latif-Eugenín et al. (2016) har evaluert ADA, SAA og mBIBG for isolering av *Aeromonas*-arter fra kunstig kontaminert vann, naturlig kontaminert vann og skalldyr prøver. Alle tre mediene ble inkubert på 30 °C i 24 timer, og mBIBG ga bedre resultater enn ADA og SAA. mBIBG var mest selektivt (100 %) blant disse tre mediene, mens ADA agarskålene viste mest veksten av andre bakterier. For den naturlig kontaminert vann og skalldyr prøver (10 g) ble de anrikede i APW (med 10 mg/L ampicillin) og inkubert på 30 °C i 24 timer. Deretter ble prøver spredt på de tre mediene og inkubert på 30 °C i 24 timer. ADA var det mest effektive mediet for isolering av *Aeromonas* fra vann, men det ble ikke observert noen forskjeller på mediene når det gjelder skalldyr prøvene.

Ut ifra disse evalueringene, viste det at BSIBG og ADA har bedre evne til å isolere *Aeromonas*-arter fra mat og vann enn andre medier. For anrikning kan APW være mest lovende mediet, ved inkubering på 28 °C i 24 timer.

8 Konklusjon

Denne oppgaven vurderte slekten *Aeromonas* som en matbåren bakterie og hvilke dyrkingsmedier som egner seg til isolering av *Aeromonas* i næringsmidler gjennom en litteraturstudie. Der finnes mange ulike selektive medier for isolering av *Aeromonas* fra næringsmidler, men det er ingen standardisert metode. Mange har derfor sammenlignet ulike mediers evne til å selektere og differensiere, og etter å ha gått gjennom andres evalueringer av dyrkingsmedier, viste det seg at BSIBG og ADA er best egnet.

Slekten *Aeromonas* finnes overalt i naturen, og kan vokse under ulike temperaturer og atmosfærer. De kan dermed vokse godt i vakuumpakket og kjølelagret mat. Innenfor slekten er det flere arter som anses som patogene, dette kan utgjøre en fare for matens mattrygghet, spesielt hos matvarer som ikke skal varmebehandles før konsum. Blant disse matvarene som har fått økt popularitet gjennom årene er sushi og ferdigpakkede salater, hvor det er blitt isolert flere ulike arter av *Aeromonas*.

Videre undersøkelser på ulike dyrkingsmedier er nødvendig, for å kunne utarbeide en standardisert metode. Det er i tillegg nødvendig med ytterligere forskning på vekst av *Aeromonas* i matvarer og hvordan veksten påvirkes av ulike parametere.

9 Referanseliste

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, pp. 135-145

Carnahan, A.M & Joseph S.W (2005) *Aeromonadales ord. nov.* 2.utg. Boston: Springer

Condalab (2019) *Agar Base Aeromonas (RYAN)*. Available at:

<https://www.condalab.com/int/en/dehydrated-culture-media/1121-8883-agar-base-aeromonas-ryan.html> (Accessed 11 May 2020)

D'Sa, E.M. & Harrison, M.A. (2010) Other bacterial pathogens: *Aeromonas*, *Arcobacter*, *Helicobacter*, *Mycobacterium*, *Plesiomonas* and *Streptococcus*, in Juneja, V.K. & Sofos J.N. (eds.) *Pathogens and toxins in foods: challenges and interventions*. Washington DC: ASM Press, pp. 181-194

Dalynn (2014) *Tryptic Soy Broth*. Available at:

http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TT86.pdf (Accessed 09 May 2020)

Daskalov, H. (2006) *The importance of Aeromonas hydrophila in food safety*, *Food Control*, 17, pp. 474-483

Efstathios, E.G. & Manuel, V.S. (2018) Pathogenic Biofilm Formation in the Food Industry and Alternative Control Strategies, in Holban, A.M. & Grumezescu, A.M. (eds.) *Foodborne Diseases: Handbook of Food Bioengineering*, 15, pp. 309-376

Farmer, J.J., Arduino, M.J. & Hickman-Brenner, F.W. (2006) The Genera *Aeromonas* and *Plesiomonas*, in Dworking, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.H. & Stackebrandt, E. (eds.) *The Prokaryotes*. New York: Springer New York, 6, pp. 564-596

Fernández-Bravo, A. & Figueras, M.J. (2020) An Update on the Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity, *Microorganisms*, 8, 129

Fricker, C.R. & Tompsett, S. (1989) *Aeromonas* spp. in foods: A significant cause of food poisoning?, *International Journal of Food Microbiology*, 9, pp. 17-23

Gorbat, P.F. & Jemmi, G. (1995) Comparison of seven selective media for the isolation of mesophilic *Aeromonas* species in fish and meat, *International Journal of Food Microbiology*, 24 (3), pp. 375-384

Granum, P.E. (2015) *Matforgiftning - Smitte gjennom mat og vann*. 4.utg. CAPPELEN DAMM

Pessoa, R.B.G., de Oliveira, W.F., Marques, D.S.C., dos Santos Correia, M.T., de Carvalho, E.V.M.M. & Coelho, L.C.B.B. (2019) The genus *Aeromonas*: A general approach. *Microbial Pathogenesis*, 130, pp. 81-94

Hardy Diagnostics (1996) *LAURYL TRYPTOSE BROTH* Available at:
https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/LaurylTryptoseBroth.htm
(Accessed 16 May 2020)

Henriksen, S.D., Bøvre, K. & Høiland, K. (2020) Bakterier, *Store Norske Leksikon*. Available at: <https://snl.no/bakterier> (Accessed 21 April 2020)

Himedia (2011) *Aeromonas Selective Agar (BSIBG Agar)* Available at:
<http://himedialabs.com/TD/M1890.pdf> (Accessed 31 April 2020)

Hoel, S., Vadstein, O. & Jakobsen, A.N. (2019) The Significance of Mesophilic *Aeromonas* spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood, *Microorganisms*, 7, 91

Hoel, S., Vadstein, O. & Jakobsen, A.N. (2018) Growth of mesophilic *Aeromonas salmonicida* in an experimental model of nigiri sushi during cold storage, *International Journal of Food Microbiology*, 285, pp. 1-6

Hoel, S., Vadstein, O. & Jakobsen, A.N. (2017) Species Distribution and Prevalence of Putative Virulence Factors in Mesophilic *Aeromonas* spp. Isolated from Fresh Retail Sushi, *Frontiers in Microbiology*, 8, 931

Isonhood, J.H. & Drake, M. (2001) *Aeromonas* Species in Foods, *Journal of Food Protection*, 65, pp. 575-582

Jakobsen, A.N., Shumilina, E., Lied, H. & Hoel, S. (2020) Growth and spoilage metabolites production of a mesophilic *Aeromonas salmonicida* strain in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) during cold storage in modified atmosphere, *Journal of Applied Microbiology*

Janda, J.M. & Abbott, S.L. (2010) The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection, *Clinical Microbiology Reviews*, 21 (1), pp. 35-73

Janet, E.L.C., Gordon, D.W.C. & Rosamund M.B. (2012) *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*. 3rd edn. Royal Society of Chemistry

Latif-Eugenín, F., Beaz-Hidalgo, R. & Figueras, M.J. (2016) Evaluation of different conditions and culture media for recovery of *Aeromonas* spp. from water and shellfish samples, *Journal of Applied Microbiology*, 121, pp. 883-891

Liu, D. (2015) *Aeromonas*, in Tang, Y.W., Sussman, M., Liu, D., Poxton, I. & Schwartzman, J. (eds.) *Molecular Medical Microbiology*. 2nd edn. Boston: Academic Press

Lowry, R., Balboa, S., Parker, J.L. & Shaw, J.G. (2014) *Aeromonas* Flagella and Colonisation Mechanisms, in Poole, R. K. (ed) *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, pp. 203-256

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Bender, K.S., Buckley, D.H. & Stahl, D.A. (2014) *Brock Biology of Microorganisms*. 14th edn. Pearson Education Limited

Mohanta, T., Goel, S. & Dutta, D. (2017) *Fundamentals of microbiology* Capital Publishing Company, Springer

Nordic-Committee-on-Food-Analysis (2004) *Mesophilic Aeromonas species. Quantification in foods and feeds*, National Veterinary Institute

Oxoid (2020a) *Aeromonas medium base (RYAN)*. Available at:

http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=SR0136&cat=&c=UK&lang=EN (Accessed 31 April 2020)

Oxoid (2020b) *Alkaline Peptone Water*. Available at:

http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=CM1028&c=UK&lang=EN (Accessed 09 May 2020)

Pandey, A., Naik, M. & Dubey, S.K. (2010) Hemolysin, Protease, and EPS Producing Pathogenic *Aeromonas hydrophila* Strain An4 Shows Antibacterial Activity against Marine Bacterial Fish Pathogens, *Journal of Marine Biology*

Perales, I. (2012) Culture Media for the Isolation of *Aeromonas* spp. and *Plesiomonas shigelloides*, in Janet, E.L.C., Gordon, D.W.C. & Rosamund M.B. (eds.) *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology*. 3rd edn. Royal Society of Chemistry, pp. 451-481

Percival, S.L. & Williams, D.W. (2014) *Aeromonas*, in Percival, S.L., Yates, M.V., Williams, D.W., Chalmers, R.M. & Gray, N.F. (eds.) *Microbiology of Waterborne Diseases*. 2nd edn. London: Academic Press, pp. 49-64

Sigma Aldrich (u.å) *Bile salts mixture* Available at:

<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma-Aldrich/Datasheet/1/b3426dat.pdf> (Accessed on 16 May 2020)

Strarev, D. & Odeyemi, O.A. (2016) Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review, *Journal of Infection and Public Health*, 9, pp. 535-544

Sumbali, G. & Mehrotra, R. (2009) *Principles of Microbiology*. Tata McGraw Hill Education Private Limited

Sundheim, G. (1991) *Aeromonas* spp. *Forekomst og utvikling i matvarer*. Ås: Norsk institutt for næringsmiddelforskning

Ribas, F., Araujo, R., Frias, J., Huguet, J.M., Ribas, F.R. & Lucena, F. (1991) Comparison of different media for the identification and quantification of *Aeromonas* spp. in water, *Antonie van Leeuwenhoek*, 59, pp. 225-228

Tomar S.K (u.å.) *Fundamentals of Microbiology*

Tsai, G.J. & Chen, T.H. (1996) Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood, *International Journal of Food Microbiology*, 31, pp. 121-131

UiO (2011) *Gram-negative bakterier*. Available at:

<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gramne.html> (Accessed 21 April 2020)

Umutoni, N. (2019) *Identification and Characterization of Aeromonas species isolated from ready-to-eat lettuce products*. Masteroppgave, Norwegian University of Science and Technology

Yaron, S. & Römling, U. (2014) Biofilm formation by enteric pathogens and its role in plant colonization and persistence, *Microbial Biotechnology*, 7 (6), pp. 496-516

Zhang, Q, Shi G.Q., Tang, G.P., Zou, Z.T., Yao, G.H. & Zeng G. (2012) A foodborne outbreak of *Aeromonas hydrophila* in a college, Xingyi City, Guizhou, China, 2012, *Western Pacific Surveillance and Response Journal*, 3 (4), pp. 39-43