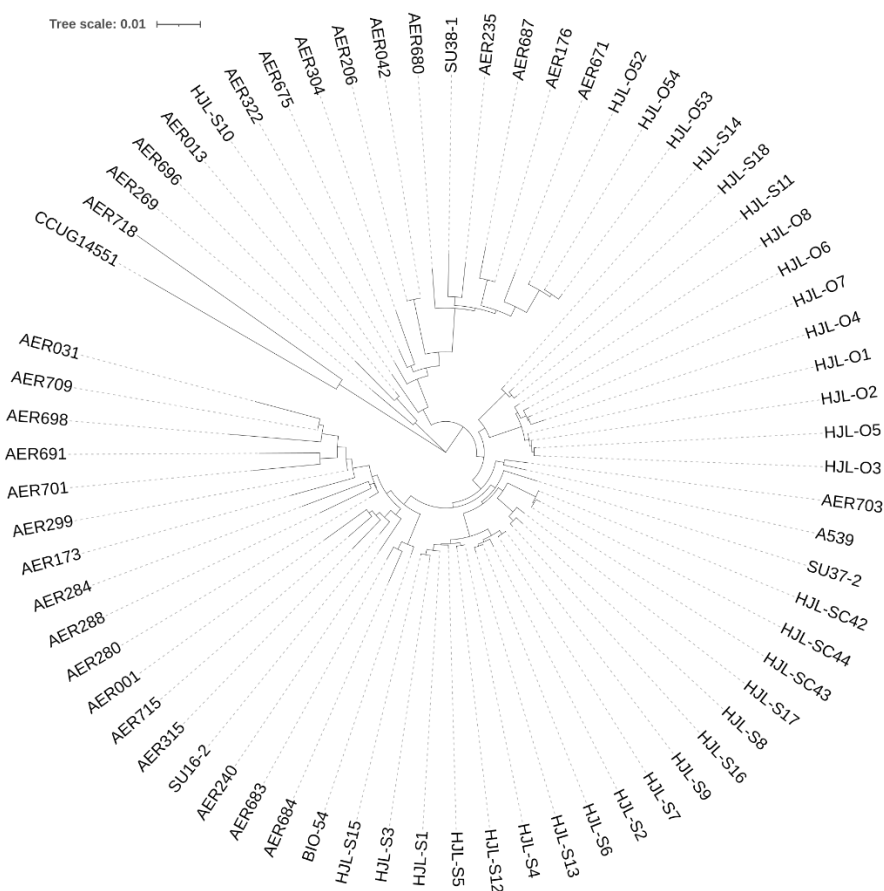


Populasjonsstudie av *Aeromonas media*



utført av

Martin Sandberg

Håvard Smalås

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

Forord

Denne bacheloroppgaven er avsluttende del av studieprogrammet Matteknologi, ved Institutt for Bioteknologi og Matvitenskap, Fakultet for Naturvitenskap, NTNU. Oppgaven teller 20 studiepoeng.

Det praktiske arbeidet har blitt utført ved mikrobiologisk laboratorium Kalvskinnet, Trondheim, våren 2021.

Vi vil gjerne gi hjertelig takk til våre veiledere Lisbeth Mehli og Sunniva Hoel for all hjelp underveis. Vi ønsker også å gi en hjertelig takk til laboratorieansvarlig Anna Lødeng for all praktisk bistand på mikrobiologisk laboratorium.

Trondheim, 20 mai 2021

Martin Sandberg



Håvard Smalås



Sammendrag

Aeromonas er en bakterieslekt som har sin opprinnelse i vann, men som påvises i næringsmidler som melk, kjøtt fisk og skalldyr. Enkelte arter av *Aeromonas* er patogene, både for dyr og for mennesker. Evnen til vekst både ved kjøletemperatur og kroppstemperatur, fører til at noen arter kan utgjøre en risiko for matvareprodusenter og forbrukere.

I tilfeller der næringsmidler ikke varmebehandles før konsum, forsvinner en viktig barriere mot patogene bakterier.

Det er knyttet en viss usikkerhet rundt identifisering og avgrensning av slekten *Aeromonas*, og denne oppgaven tok for seg tidligere isolater av *A.media* fra spiseklare sjømatprodukter.

Hovedmålet var å re-identifisere isolatene for å undersøke om alle isolatene besto av *A.media*, eller om det var snakk om flere arter.

Formålet med denne oppgaven var å bidra til mer presis identifikasjon av *Aeromonas media* og dens nærliggende slektninger som eks. *A. hydrophila*.

Abstract

Aeromonas is a genus originating in water, but frequently isolated from foods like milk, meat, fish and shellfish. Some species are pathogenic to both humans and animals. The ability to grow at both low and body temperature makes some species a risk for food producers and consumers.

Food that is not heat-treated loses an important barrier against pathogenic bacteria.

Concerning the identification and delienation of the genus *Aeromonas*, there is some uncertainty. This work concerns earlier isolates of *A.media* gathered from ready-to-eat seafood products.

The main goal of this work is to examine if said isolates identify as *A.media*, and to examine if there are other species present.

The purpose of this work is to contribute toward a more precise identification of *Aeromonas media* and related species e.g. *A.hydrophila*.

Innholdsfortegnelse

1	Innledning.....	1
2	Teoretisk bakgrunn.....	2
2.1	<i>Aeromonas</i> -slekten	2
2.2	<i>Aeromonas</i> og patogenisitet.....	4
2.3	<i>Aeromonas</i> og mattrygghet.....	5
2.4	Fylogeni og identifikasjon av <i>Aeromonas</i>	6
3	Materialer og metoder	7
3.1	Bakterieisolater	7
3.1.1	Dyrking og inkubasjon	8
3.2	Identifisering av isolater	8
3.2.1	DNA-ekstraksjon.....	8
3.2.2	PCR av husholdningsgenene <i>radA</i> og <i>rpoD</i>	8
3.2.3	Gelelektroforese	9
3.2.4	Rensing og fortykning av PCR-produkt.....	10
3.2.5	Fylogenetiske analyse og identifisering	10
4	Resultater.....	11
4.1	Dyrking og inkubasjon	11
4.1	DNA-ekstraksjon	11
4.2	PCR og gelelektroforese	12
4.3	Sekvensering.....	13
4.4	Fylogenetisk analyse.....	17
5	Diskusjon.....	25
5.1	Dyrking og inkubasjon	25
5.2	DNA-ekstraksjon, PCR og sekvensering.....	25
5.3	Identifikasjon	25
6	Konklusjon	29
7	Forslag til videre arbeid.....	29
8	Referanser.....	30

1 Innledning

Presis identifisering av patogene bakterier har direkte innvirkning på sykdomsforløp, og er av stor betydning for folkehelsen. For matvareprodusenter og forbrukere, betyr presis identifisering økt mattrygghet og økt forbrukertillit.

Aeromonas er en bakterieslekt som har sin opprinnelse i vann, men som påvises i næringsmidler som melk, kjøtt fisk og skalldyr. Enkelte arter av *Aeromonas* er patogene, både for dyr og for mennesker. Evnen til vekst både ved kjøletemperatur og kroppstemperatur, fører til at noen arter kan utgjøre en risiko for matvareprodusenter og forbrukere.

I tilfeller der næringsmidler ikke varmebehandles før konsum, forsvinner en viktig barriere mot patogene bakterier. Publikasjonene av Hoel et al. (2017), Lee et al. (2020) og Umutomi et al. (2020) omhandler *Aeromonas* påvist i sushi, østers, skalldyr og salat. En forholdsvis stor andel av disse ble identifisert som *A.media*, men identifisering og artsavgrensning innen *Aeromonas* er preget av usikkerhet. Denne oppgaven vil ta for seg isolater fra de foregående studiene.

Formålet med denne oppgaven er å bidra til mer presis identifisering av *Aeromonas media* og dens nærliggende slektninger som eks. *A. hydrophila*.

Hovedmålet med oppgaven er å re-identifisere isolatene for å finne ut om alle er *A.media*, eller om isolatene består av flere arter.

For å oppnå dette er oppgaven delt inn i følgende delmål:

- 1 Dyrke og inkubere isolater av *Aeromonas*.
- 2 Ekstraksjon av DNA og PCR-amplifikasjon av husholdningsgenet *radA*.
- 3 Sekvensering ved eksternt laboratorium (Eurofins Genomics).
- 4 Identifisere gensekvenser ved å sammenligne med database.
- 5 Konstruere fylogenetisk tre for å undersøke slektskap.

Opgaven ble utvidet underveis i arbeidet, til å inkludere husholdningsgenet *rpoD* for et utvalg isolater.

2 Teoretisk bakgrunn

2.1 *Aeromonas*-slekten

Slekten *Aeromonas* tilhører klassen Gammaproteobacteria, orden Aeromonadales, i familien *Aeromonadaceae*. Slekten kjennetegnes av at artene er Gram-negative, fakultativt anaerobe og kjemoorganotrofe - med oksidativ og fermentativ metabolisme av D-glukose. De er syre-, og ofte gassproduserende, og i stand til å redusere nitrat til nitritt. Slekten er som oftest positiv på oksidase og katalasetest. Cellestørrelsen varierer fra 0,3-1,0 x 1,0-3,5µm, og den kan opptre både enkeltvis og parvis, noen ganger i korte kjeder. Flere arter viser bevegelse, med en eller flere flageller. Yttergrenser for vekst er mellom 0°C og 45°C, og optimumstemperaturen ligger mellom 22°C og 37°C. Noen arter vokser ikke over 35°C. *Aeromonas* har tradisjonelt blitt inndelt i to grupperinger, en større gruppe med bevegelige, mesofile *Aeromonas* og en mindre gruppe av *Aeromonas* som er mer psykrotrofe (Martin-Carnahan & Joseph, 2005).

Tabell 1 angir generelle vekstbetingelser for *Aeromonas*:

Tabell 1: Generelle vekstbetingelser for *Aeromonas* (Granum, Rørvik, Aspholm, & Wasteson, 2015)

Vekstbetingelser	
Temperatur	0-45°C
pH	Ned til 4,5 ved romtemperatur, 5,5 ved 5°C
NaCl	Opp til 3,5%
a _w	0,97
Atmosfære	Fakultativt anaerob, vokser i modifisert atmosfære

Aeromonas har til nå 36 beskrevne arter (Tabell 2), og alle har sin opprinnelse i vandig miljø (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). Slekten er frittlevende, og har en stor evne til hurtig kolonisering av nye miljøer, fra forurenset eller klorbehandlet vann til insekter, fisk, skaldyr og pattedyr (Janda & Abbott, 2010).

Tabell 2 Arter i slekten *Aeromonas* (Fernández-Bravo & Figueras, 2020; Hoel, Vadstein, & Jakobsen, 2019).

Art	Referanse
<i>A. allosaccharophila</i>	(A J Martínez-Murcia, Esteve, Garay, & Collins, 1992)
<i>A. aquatica</i>	(R Beaz-Hidalgo et al., 2015)
<i>A. aquatilis</i>	(M J Figueras et al., 2016)
<i>A. australiensis</i>	(Aravena-Roman et al., 2013)
<i>A. bestiarum</i>	(Ali, A.; Carnahan, A.; Altwegg, M.; Luthy-Hottenstein, J.; Josep, 1996)
<i>A. bivalvium</i>	(Minana-Galbis, Farfan, Fuste, & Loren, 2007)
<i>A. cavernicola</i>	(A. Martínez-Murcia et al., 2013)
<i>A. caviae</i>	(Schubert & Hegazi, 1988)
<i>A. crassostreae</i>	(M J Figueras et al., 2016)
<i>A. dhakensis</i>	(Roxana Beaz-Hidalgo, Martínez-Murcia, & Figueras, 2013)
<i>A. diversa</i>	(Minana-Galbis, Farfan, Gaspar Loren, & Carmen Fuste, 2010)
<i>A. encheleia</i>	(Esteve, Gutiuréz, & Ventosa, 1995)
<i>A. enterica</i>	(M J Figueras et al., 2016)
<i>A. eucrenophila</i>	(Schubert & Hegazi, 1988)
<i>A. finlandiensis</i>	(R Beaz-Hidalgo et al., 2015)
<i>A. fluvialis</i>	(Alperi, Martínez-Murcia, Monera, Saavedra, & Figueras, 2010)
<i>A. hydrophila</i>	(Stanier, 1943)
<i>A. intestinalis</i>	(M J Figueras et al., 2016)
<i>A. jandaei</i>	(A. Carnahan, Fanning, & Joseph, 1991)
<i>A. media</i>	(Allen, Austin, & Colwell, 1983)
<i>A. molluscorum</i>	(Minana-Galbis, Farfan, Fuste, & Loren, 2004)
<i>A. lacus</i>	(R Beaz-Hidalgo et al., 2015)
<i>A. lusitana</i>	(A. Martínez-Murcia et al., 2016)
<i>A. piscicola</i>	(R Beaz-Hidalgo, Alperi, Figueras, & Romalde, 2009)
<i>A. popoffii</i>	(Huys et al., 1997)
<i>A. rivipollensis</i>	(Marti & Balcázar, 2015)
<i>A. rivuli</i>	(M J Figueras et al., 2011)
<i>A. salmonicida</i>	(Griffin, Sniezko, & Friddle, S, 1953)
<i>A. sanarelli</i>	(Alperi, Martínez-Murcia, et al., 2010)
<i>A. schubertii</i>	(Hickman-Brenner, Fanning, Arduino, Brenner, & Farmer, 1988)
<i>A. simiae</i>	(Harf-Monteil et al., 2004)
<i>A. sobria</i>	(Popoff & Véron, 1976)
<i>A. taiwanensis</i>	(Alperi, Martínez-Murcia, et al., 2010)
<i>A. tecta</i>	(Demarta et al., 2008)
<i>A. trota</i>	(A. M. Carnahan et al., 1991)
<i>A. veronii</i>	(Hickman-Brenner, MacDonald, Steigerwalt, Fanning, & Farmer III, 1987)

Aeromonas media ble første gang isolert og beskrevet i 1983, i elvevann i nærheten av et oppdrettsanlegg i England (Allen et al., 1983). I ettertid har den blitt funnet bl.a. i drikkevann, avløpsvann samt hos mennesker (Pablos, Rodríguez-Calleja, Santos, Otero, & García-López, 2009; Picão et al., 2008; Roger, Marchandin, Jumas-Bilak, Kodjo, & Lamy, 2012).

2.2 *Aeromonas* og patogenisitet

Flere arter innen slekten *Aeromonas* har de siste seksti årene blitt assosiert med både diareysykdommer og sårinfeksjoner hos mennesket. *Aeromonas*-artene kan produsere sykdomsfremkallende ekstracellulære biologisk aktive proteiner- som hemolysiner, cytotoxiner og enterotoxiner (Granum et al., 2015).

Hos mennesker er gastroenteritt den sykdommen som er hyppigst assosiert med *Aeromonas*, etterfulgt av sårinfeksjoner. De mest vanlige involverte artene som har blitt isolert ved tilfeller av gastroenteritt er *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* (Parker & Shaw, 2010), samt *A. dhakensis* (Teunis & Figueras, 2016).

Infeksjoner med *Aeromonas* kan forårsake sepsis og bakteriemi hos utsatte nyfødte og voksne med nedsatt immunforsvar. Infeksjoner kan også forekomme sekundært etter brannskader, eller hos traumepasienter. I sjeldne tilfeller har det også blitt beskrevet hemolytisk-uremisk syndrom (HUS) assosiert med *Aeromonas* (Ma. José Figueras et al., 2007; Harrison & Fauci, 2008).

Patogenisitet ved *Aeromonas* avhenger av om genomet inneholder gener som koder for virulensfaktorer, og hvordan disse blir uttrykt. Noen virulensfaktorer kan være kontinuerlig til stede, mens andre blir uttrykt ved visse miljømessige faktorer som f.eks. en spesifikk temperatur eller næringskonsentrasjon. Hvilke virulensfaktorer som kommer til uttrykk avgjør ofte hvilket sykdomsbilde som oppstår (Doyle, Diez-Gonzalez, & Hill, 2019).

A. media er et tilsynkommende og opportunistisk patogen. Den kan forårsake diare hos mennesker samt hudsår i fisk. Prevalensen av sykdom assosiert med *A. media* er lavere enn ved sykdom assosiert med artene *A. hydrophila*, *A. caviae*, *A. veronii* (Parker & Shaw, 2010; Talagrand-Reboul et al., 2017).

A. salmonicida subsp. *salmonicida* forårsaker fiskeesykdommen furunkulose. Sykdommen angriper fisk i laksefamilien, både villfisk og oppdrettsfisk. Oppdrettsfisk kan bli svært hardt rammet av sykdomsutbrudd, hvis besetningene ikke er vaksinert (Dallaire-Dufresne, Tanaka, Trudel, Lafaille, & Charette, 2014).

2.3 *Aeromonas* og mattrygghet

Flere faktorer avgjør mattrygghet. Disse er blant annet råvarekvalitet og produktegenskaper som vannaktivitet, pH og saltinnhold. Videre er lagringstid og temperatur, prosess teknologi, atmosfære, produksjonshygiene og krysskontaminering mellom ingredienser viktige faktorer (Hoel et al., 2019).

Varmebehandling og kjøling av næringsmidler er vanlige og enkle metoder for å unngå eller begrense vekst av mikroorganismer i næringsmidler. Temperatur over 45°C dreper de fleste artene i kultur, men *A. hydrophila* kan overleve ved høyere temperaturer. Både *A. hydrophila*, *A. caviae* og *A. veronii* tåler nedfrysning (Doyle et al., 2019).

Aeromonas-slekten har sin opprinnelse i vandig miljø, og landbruksprodukter kan bli kontaminert gjennom vanning. For mesofile *Aeromonas* er kontaminert drikkevann, samt inntak av kontaminerte næringsmidler den mest sannsynlige årsaken til at mennesker blir kolonisert eller infisert. I tillegg kan skalldyr som østers og muslinger, som er filterspisere, oppkonsentrere *Aeromonas*, og disse utgjør dermed også en fare (Janda & Abbott, 2010).

I tilfeller der næringsmidler ikke varmebehandles før konsum, forsvinner en viktig barriere mot patogene bakterier. Det er vanligere å finne *Aeromonas* i sjømatprodukter, sammenlignet med andre matprodukter, fordi slekten er så utbredt i vandige miljøer. Dette, kombinert med vekst ved både kjøletemperatur og kroppstemperatur, gjør at spiseklare sjømatprodukter utgjør en risiko. *Aeromonas* er påvist i spiseklare produkter som sushi, østers og kamskjell (Hoel, Mehli, Bruheim, Vadstein, & Jakobsen, 2015; Lee et al., 2020).

Aeromonas sp. i mikrofloraen hos produksjonsdyr i landbruket kan utvikle antibiotikaresistens, der *A. hydrophila* hyppigst blir isolert fra kjøttprodukter. Både *A. hydrophila* og *A. caviae* er hyppige funn i upasteurisert melk. Bakterier fra *Aeromonas*-slekten i produksjonsdyr utgjør dermed en risiko for matindustri og forbruker, både med tanke på gastroenteritt, bedervelse og kvalitetsforringelse av matvarer. Det er også risiko for at *Aeromonas* vil være et reservoar for antibiotikaresistens (Doyle et al., 2019).

Spiseklare produkter av bladgrønnsaker kan også utgjøre et risikoprodukt. Bladgrønnsaker kan bli kontaminert ved vanning, og kutting øker risikoen for krysskontaminasjon.

Aeromonas har blitt påvist i spiseklare produkter av ruccolasalat og spinat (Umutoni et al., 2020).

2.4 Fylogeni og identifikasjon av *Aeromonas*

Den tradisjonelle inndelingen av *Aeromonas*-slekten har vært å skille mellom en bevegelig mesofil gruppe, eksemplifisert av *A. hydrophila* og en stasjonær psykrofil gruppe -som inneholdt fiskepatogenet *A. salmonicida*. Etter hvert som mer moderne metoder -DNA hybridiseringsteknikker- har blitt tilgjengelige, har også inndelingen av slekten forandret seg. Antallet nye beskrevne arter innen slekten har økt betraktelig, og i stor grad er dette forbundet med nyere metoder for DNA-sekvensering, og da hovedsakelig delvis eller fullstendig sekvensering av 16S rRNA genet (Janda & Abbott, 2010).

16S rRNA er et gen som finnes i alle bakterier. Det er et gen som forandrer seg lite over tid, fordi det koder for helt nødvendige egenskaper for cellefunksjon. Selv om den helt nøyaktige hastigheten for hvordan 16S rRNA genet forandrer seg over tid ikke er kjent, kan sekvensen brukes til å vise evolusjonær distanse og slektskap mellom arter. Sekvensen kan sees på som en «molekylær klokke». Sekvensanalyse basert på 16S rRNA genet har vært vesentlig mye bedre til å skille bakteriestammer, sammenlignet med tidligere fenotypiske metoder (Clarridge III, 2004; Woese, 1987).

For *Aeromonas*-slekten har identifisering ved hjelp av 16S rRNA gensekvensering vist seg å være problematisk. 16S rRNA genet kan brukes til å identifisere *Aeromonas* til slektsnivå, men klarer ikke alltid å skille på artsnivå (Nagar, Shashidhar, & Bandekar, 2013). Årsaken til dette kan være at 16S rRNA genet hos *Aeromonas* forandrer seg svært lite over tid sammenlignet med andre bakterier, og er nærmest identisk mellom noen nært beslektede arter som eksempelvis *A. hydrophila* og *A. media* (A. J. Martínez-Murcia et al., 2005; Navarro & Martínez-Murcia, 2018).

Det har imidlertid vist seg at gener som koder for proteiner involvert i cellens prosessering av DNA («Housekeeping Genes») også kan brukes som evolusjonære markører for å skille bakteriearter. Proteiner har såkalt degenerativ kode – forandring i nukleotidsekvens gir ikke nødvendigvis noen forandring i proteinstruktur. Derfor kan mutasjoner forekomme langs genet uten at det gir noen forandring i aminosyrerekkefølge. Nedarvingen av disse genene skiller seg fra 16S rRNA genet, der mutasjoner kun forekommer på spredte posisjoner (Navarro & Martínez-Murcia, 2018; Yamamoto & Harayama, 1995).

Genet *gyrB*, som koder for en del av type II DNA-isomerase, var det første som ble brukt i en fylogenetisk studie av *Aeromonas*, og viste seg å være vesentlig bedre til å skille *Aeromonas*

på artsnivå sammenlignet med 16S rRNA genet (Yanez, Catalan, Apraiz, Figueras, & Martinez-Murcia, 2003).

Senere ble det vist at husholdningsgenet *rpoD*, som koder for en initieringsfaktor for RNA polymerase, hadde lignende egenskaper til å skille mellom arter av *Aeromonas* (Soler et al., 2004).

Metoden ble igjen forbedret ved å kombinere flere forskjellige husholdningsgener og slå sammen delsekvensene – konkatenering. Sammenligning av de sammensatte sekvensene gjorde det mulig å konstruere fylogenetiske trær med en avgrensning mellom arter med mindre usikkerhet enn det som var mulig med enkeltgener (Antonio J Martinez-Murcia et al., 2011).

I takt med at nyere metoder innen molekylærgenetikk har ført til oppføring av nye arter innen *Aeromonas*-slekten, har det også foregått en reklassifisering av tidligere beskrevne arter (Roxana Beaz-Hidalgo et al., 2013). Dette har tidvis vært kontroversielt, og kan begrunnes med at det har vært et fokus på å organisere *Aeromonas*-slekten langs flere artskomplekser – dvs. heterogene grupperinger med beslektede, men genetisk forskjellige stammer (Talagrand-Reboul et al., 2017).

3 Materialer og metoder

3.1 Bakterieisolater

I alt 93 isolater fra tidligere studier ble benyttet (Hoel et al., 2017; Lee et al., 2020; Umutoni, 2019; Umutoni et al., 2020) Av disse var 56 isolert fra spiseklare salatprodukter i 2012, og i 2019 identifisert som hovedsakelig *Aeromonas media* via sekvensering av *gyrB*-genet (Umutoni, 2019). Isolater var fra ulike fiskeprodukter, hvorav 5 var isolert fra sushi i 2017 (Hoel et al., 2017). For resten av fiskeisolatene kom 18 fra sushi i en annen studie, 11 fra europeisk østers og 3 fra kamskjell isolert i 2020 (Lee et al., 2020).

Samtlige isolater fra både salat- og fiskeprodukter var blitt isolert, sekvensert (*gyrB*) og fenotypisk testet iht. Nordisk Metodekomité for næringsmidler (NMKL) metode nr. 150 (2004). Siden var isolatene blitt lagret ved -80°C i Trypticase Soy Broth (TSB) tilsatt 20% glyserol for videre analyser.

I tillegg til de 93 isolatene ble *A. hydrophila* (CCUG14551) brukt som referansestamme og fungerte som negativ kontroll etter sekvensering i dette forsøket.

3.1.1 Dyrking og inkubasjon

De frosne isolatene ble hentet fra fryselagring ved og plassert i en kuldeblokk og fraktet til sterilbenk. En liten mengde fra hvert isolat ble hentet ut fra rørene og strøket ut på en Tryptic Soy Agar (TSA; 84602.0500, VWR Chemicals)-plate før de ble inkubert aerobt ved 37°C i 24-48 timer. Hver plate ble kontrollert for vekst og en enkel koloni ble overført og spredd på en ny TSA-plate for ny inkubering i 24-48 timer for å sikre at det var en renkultur.

Isolater som ikke fikk påvist vekst etter 48 timer ble på nytt hentet fra fryselagring og spredd ut på nye TSA-plater og inkubert ved 37°C i et nytt forsøk på å få vekst.

Isolater som etter tredje dyrking på TSA ikke fikk påvist vekst ble forsøkt suspendert fra fryselagring i sterile 15ml sentrifugerør med 10ml TSB og inkubert ved 37°C. Etter 48 timer ble buljongen kontrollert for vekst ved å visuell inspeksjon for å sjekke om det hadde blitt en endring i turbiditet.

3.2 Identifisering av isolater

3.2.1 DNA-ekstraksjon

For isolatene med påvist vekst ble det overført en liten mengde fra TSA-platene til en suspensjon av 1ml TE-buffer for ekstraksjon av DNA (DNeasy Blood and tissue kit, 69506; Qiagen 2006) og ekstraksjonen foregikk etter protokollen for gram-negative bakterier. For å oppnå høyere DNA-konsentrasjon ble det benyttet 100 µl i stedet for 200 µl buffer AE i siste filtreringssteg.

For å kvantifisere ekstrahert DNA ble alle prøver analysert med programmet Gen5 2.0 tilkoblet BioTek PowerWave XS spektrofotometer. For prøver med < 5 ng/µl DNA ble ekstraksjonsprosessen utført på nytt. Prøver over 5 ng/µl ble godkjent for bruk i PCR. Isolert DNA ble lagret ved 4°C inntil videre behandling.

3.2.2 PCR av husholdningsgenene *radA* og *rpoD*

PCR-reaksjonene ble gjennomført basert på prosedyre beskrevet i Umutoni et al. (2020). Reaksjonen besto av 2,5µl 10x PCR buffer (Qiagen), 0,5 µl MgCl₂ (25 mM, Qiagen), 0,5µl dNTP (201900, Qiagen), 0,13 µl Hot Star Taq Polymerase (5 units/µl, Qiagen), 16,87µl nukleasefritt vann (AM9937, Ambion), 1µl primer F, 1µl primer R (Tabell 3), og 2,5µl templat DNA til totalt volum på 25 µl.

PCR reaksjonen ble gjennomført i VWR® Doppio Thermal Cycler der prøvene først ble varmet opp til 95°C for denaturering i 15 min. fulgt av 30 sykluser á 30 sek. denaturering ved 95°C, 30 sek. hybridisering ved 52-58°C (Se Tabell 3) og 60 sek. ved 72°C for polymerisering.

En testkjøring med 7 DNA-isolater ble gjennomført for å kontrollere at de benyttede primerparene og PCR-programmene amplifiserte det ønskede gen.

Alle de utvalgte isolatene fra sjømat og salat som vokste opp på TSA ble sekvensert med *radA*. I tillegg ble utvalgte isolater sekvensert for *rpoD*. Hvilke isolater det skulle amplifiseres *rpoD* fra ble valgt ut fra lavest ID% fra *gyrB*-sekvensene i Umutonis forsøk (Umutoni, 2019).

Tabell 3: PCR-primere, hybridiseringstemperatur og forventet amplikonlengde

Gen	Primer	Primersekvens	Hybridiserings- temperatur	Amplikon- lengde	Referanse
<i>radA</i>	F	5'-ATGCATCACCTGGATGGAGT	58°C	405-414 bp	(Roger et al., 2012)
	R	5'-TGCCTATGTTTGTACCGAATG			
<i>gyrB</i>	3F	5'-GAAGGCCAAGTCGGCCGCCAG	52°C	1100 bp	(Tacão et al., 2005)
	14R	5'-ATCTTGGCATCGCCCGGGTTTTC			
<i>rpoD</i>	4F	5'-GAAGGCGAAATCGACATC	52°C	700-800 bp	(Antonio J Martinez-Murcia et al., 2011)
	11R	5'-ATGCTCATGCGRCGGTTGAT			

3.2.3 Gelelektroforese

For å verifisere at riktig PCR produkt var blitt amplifisert gjennomgikk alle ferdige PCR-produkt en gelelektroforese i 1,2% agarosegel for å visualisere genene. For en 15cm x15cm gel ble det benyttet 1,8 g Lonza™ SeaKem® LE Agarose (50004, Fisher Scientific) blandet ut i 150 ml 1x TAE-buffer tilsatt 1,6µl GelRed for farging etter at agarosen hadde løst seg. Blandingen ble varmet opp i mikrobølgeovn (uten GelRed) til like under kokepunktet for å løse opp agarosen og for å minimere bobler i gelen. 15cm x 15cm gel ble støpt med 15-26 brønner per rad, avhengig av hvor mange prøver som skulle kjøres.

PCR-prøvene ble klargjort for gelelektroforese ved å blande 10µl PCR-produkt med 2,5µl nukleasefritt vann og 2,5µl 6x DNA Loading Dye (R0611, Thermo Scientific™).

Etter ferdig stivnet gel var blitt montert i bufferkammeret og suspendert i 1x TAE-buffer ble det plassert 2µl GeneRuler 1kb Plus DNA ladder (SM1331, Thermo Scientific™) i den ytterste brønnen som markør. I resterende brønner ble gelbrønnene tilsatt 10µl av hvert PCR-

produkt tilsatt loading buffer. Gelelektroforesen ble kjørt på 90V, i 60 minutter før den ble flyttet over til Syngene G:BOX for UV-bestråling og fotografering med GeneSys-programvaren fra Syngene.

Prøver med enkeltstående bånd med forventet amplikonlengde (se Tabell 3) ble godkjent for rensing og sekvensering. Prøver uten bånd eller antydning til kontaminasjon ble underkjent og ny PCR ble utført med isolert DNA fra kap. 3.2.1.

3.2.4 Rensing og fortynning av PCR-produkt

Rensing av godkjent PCR-produkt ble utført iht. protokoll for ExoSAP-IT™ (78201.1.ML t, Thermo Fisher). PCR-produkt (5 µl) ble tilsatt 2µl ExoSAP-IT, deretter inkubert ved 37°C i 15 min for degradering av resterende primere og nukleotider, deretter 85°C i 15 minutter for å aktivere ExoSAP-IT-reagenser. Etter rensiprogrammet var gjennomført ble hvert rensede PCR-produkt tilsatt 10µl nukleasefritt vann for å sikre nok volum til kvantifisering. Deretter ble prøvene kvantifisert med BioTek PowerWave XS spektrofotometer. Ønsket genkonsentrasjon for sekvensering var 12,5 ng/µl, og etter første kvantifisering ble det beregnet hvor mye nukleasefritt vann som måtte tilsettes prøver over denne konsentrasjonen ($c_1V_1 = c_2V_2$). Prøver med lavere enn ønsket konsentrasjon forble ufortynnet. Etter fortynning ble det tatt stikkprøver til kvantifisering fra åtte prøver for å kontrollere at beregningene stemte.

Etter at riktig konsentrasjon av produktet var oppnådd, ble 5µl av det rensede PCR-produkt tilsatt i sekvenseringsbrettet og tilsatt 5µl av en av primerne (5mM). De 74 *radA*-produktene ble tilsatt primer *radA-F*, og de 21 *rpoD*-produktene ble tilsatt primer *rpoD-4F*. Sekvenseringsbrettet (96 brønner) var tilsatt 95 prøver og ble deretter sendt til sekvensering hos EuroFins Genomics, Tyskland. Den siste brønnen var forbeholdt internkontroll hos EuroFins.

3.2.5 Fylogenetiske analyse og identifisering

I tillegg til *radA*- og *rpoD*-sekvensene ble det benyttet *gyrB*-sekvenser fra tidligere forsøk med de samme isolatene (Hoel et al., 2017; Lee et al., 2020; Umutoni et al., 2020). Sekvensene ble sammenstilt i MEGA-X (Kumar, Stecher, Li, Knyaz, & Tamura, 2018) med CLUSTALW-algoritmen (Thompson, Higgins, & Gibson, 1994) hvorpå *radA*- og *gyrB*-sekvensene ble konkatenerert i MEGA-X. Fylogenetiske trær ble så bygget i MEGA-X av de konkatenererte sekvensene ved neighbor-joining-metoden (Saitou & Nei, 1987) med Kimura 2 -

modellen (Kimura, 1980). Stammen AER718 (*A. salmonicida*) og referansestammen CCUG14551 (*A. hydrophila*) ble benyttet som utgruppe.

Artsidentifisering av isolatene ble gjort ved å sammenligne sekvensene med sekvenser som er registrert i BLAST-databasen (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, 2021).

Søkeparametere var «Standard databases» og «Nucleotide collection (nr/nt)». Valgt programoptimalisering var «Highly similar sequences».

4 Resultater

4.1 Dyrking og inkubasjon

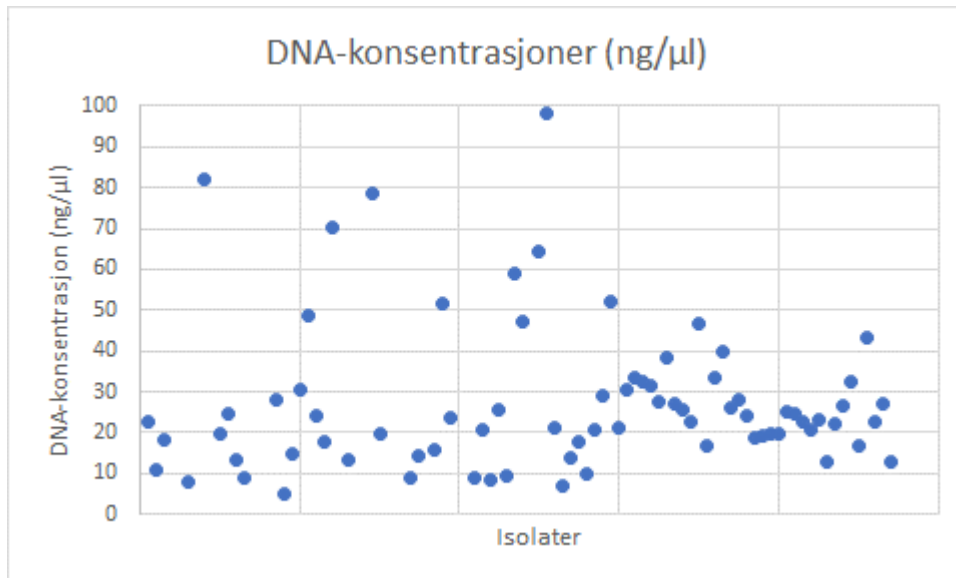
Det ble påvist aerob vekst i 76 av 94 isolater. De 18 resterende isolatene viste ingen tegn til vekst selv etter til sammen tre forøk med oppdyrking på TSA, samt ett forsøk i TSB, alle ved 37°C. Isolatene uten vekst var alle isolert fra salat i 2012 og lagret ved -80°C.

Kontaminasjon ble observert i prøve AER655 og AER689, som derfor ble dyrket på nytt.

4.1 DNA-ekstraksjon

Alle isolater med påvist vekst gav utbytte ved DNA-ekstraksjon. Utbytte av DNA fra isolatene varierte mellom 5,08 ng/μl og 98,3 ng/μl. Konsentrasjonene av ekstrahert DNA fra alle isolatene er vist i Vedlegg 1. Laveste DNA-konsentrasjon benyttet i PCR-reaksjonene var

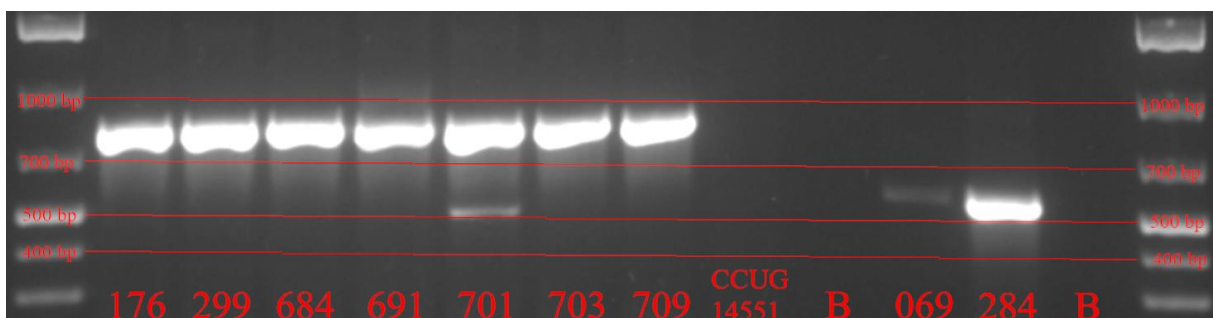
5,08 ng/μl, og høyeste 81,98 ng/μl. Alle isolater med påvist vekst gav utbytte ved DNA-ekstraksjon. En visualisering av spredningen for DNA-konsentrasjoner er vist i Figur 1.



Figur 1: Variasjon i DNA-konsentrasjoner

4.2 PCR og gelelektroforese

PCR-analyse av *radA* påviste amplifisering av genet i 74 av 76 isolater med påvist aerob vekst. Positive PCR-produkter gav bånd ved ~550 bp. PCR-analyser ble også gjennomført for *rpoD* i 30 isolater, hvorav 30 prøver gav positive PCR-produkter med bånd ved ~750 bp. Figur 2 viser eksempler på godkjente (prøve 176, 299, 684, 691, 703, 709, 069 og 284) og underkjente (prøve 701 og CCUG14551) PCR-produkt for *radA* og *rpoD*. Oversikt over gener amplifisert fra de ulike isolatene kan ses i Vedlegg 1.

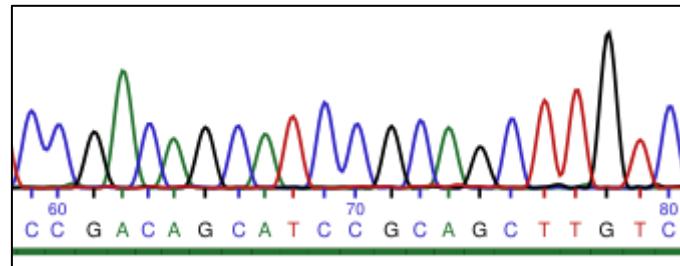


Figur 2: Eksempelbilde med godkjente og underkjente amplikon for *rpoD* (prøve 176-CCUG14551) og *radA* (prøve 069-284) avbildet i gel. Tallkodene tilhører isolatene fra salat, CCUG14551 er referansestammen for *A. hydrophila*, og B er blanke prøver. Resultatene for 701 og CCUG14551 ble denne kjøringen underkjent.

PCR-produktet til AER331 hadde fordampet under lagring gjennom en sprekk i prøvebrettet da prøven skulle klargjøres for sekvensering, og ble derfor ikke sekvensert til tross for godkjent PCR-produkt gjennom gelelektroforese.

4.3 Sekvensering

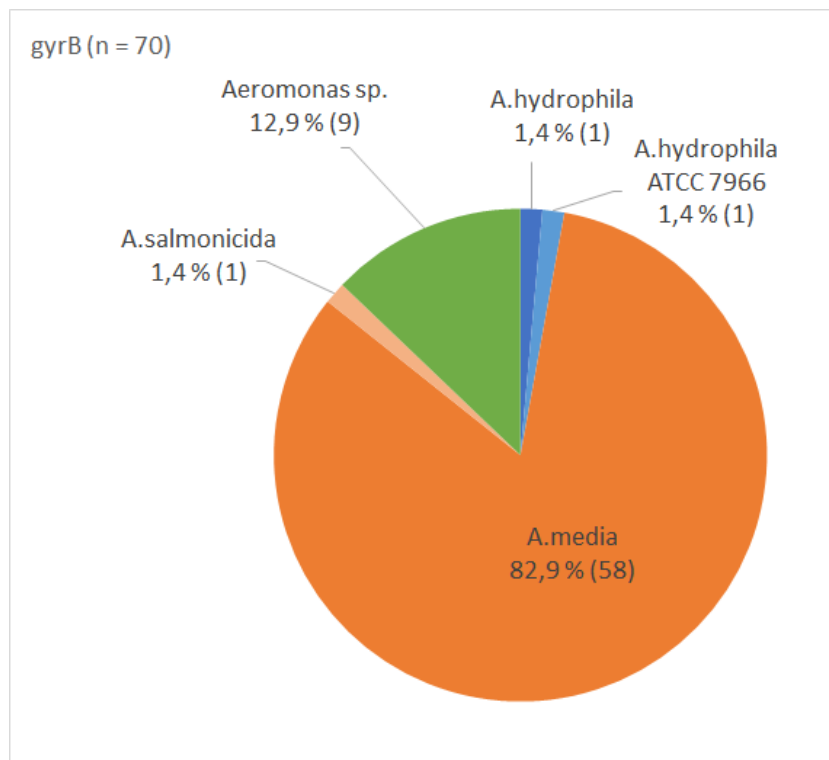
Av 95 innsendte PCR-produkter ble 91 vellykket sekvensert. PCR-produktene som lot seg sekvensere bestod av 71 *radA*-produkt og 20 *rpoD*-produkt. Ferdigklippede sekvenser fra Eurofins hadde lengder mellom 271 – 471 bp for *radA* og 727 – 743 for *rpoD*. *GyrB*-sekvensene var hentet fra tidligere forsøk hadde sekvenslengder mellom 622 – 1126 bp. Figur 3 viser et utsnitt fra kromatogrammet etter sekvensering av *radA*-produktet fra prøve AER001, som er representativt for sekvensene som ble benyttet i BLAST-søkene.



Figur 3: Utsnitt fra kromatogrammet etter sekvensering av *radA*-produktet fra prøve AER001. Grønn linje under basene indikerer en Phred kvalitetskår på ≥ 30 , dvs. $\geq 99,9\%$ sannsynlighet for at riktig base er identifisert (Ewing, Hillier, Wendl, & Green, 1998).

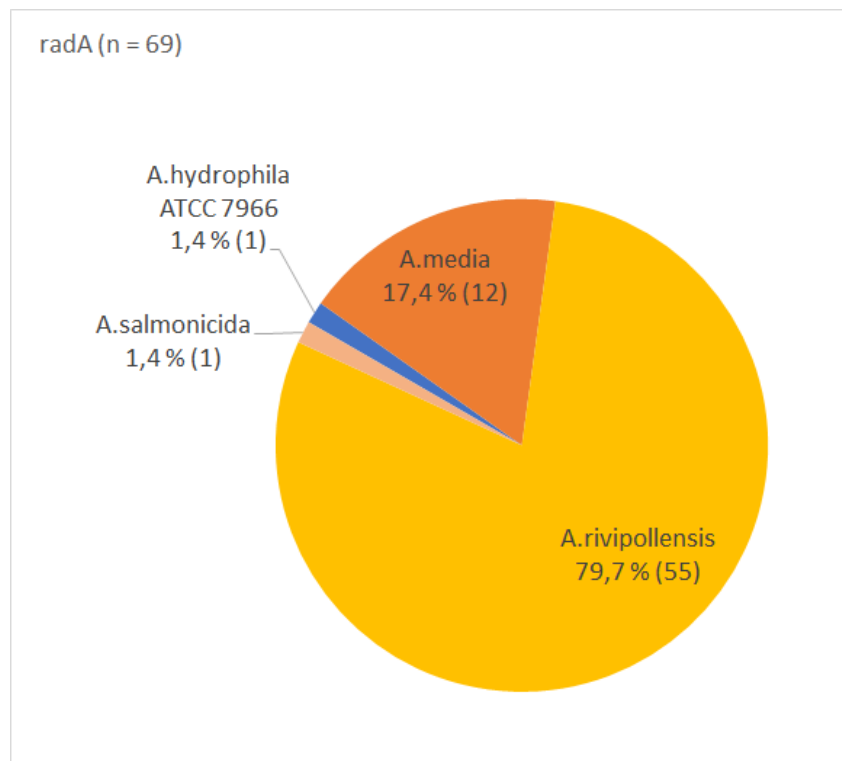
Isolat AER689 (*rpoD*) ble presumptivt identifisert som *Pseudomonas fluorescens*. Isolat AER655 hadde en baseparlengde på 271 basepar. Begge ble utelatt fra videre analyse.

Ved søk i BLAST-programmet med *gyrB*-sekvensene fra de tidligere forsøkene ble majoriteten av isolatene identifisert som *A. media* (58 isolater; 82,9%) (Figur 4).



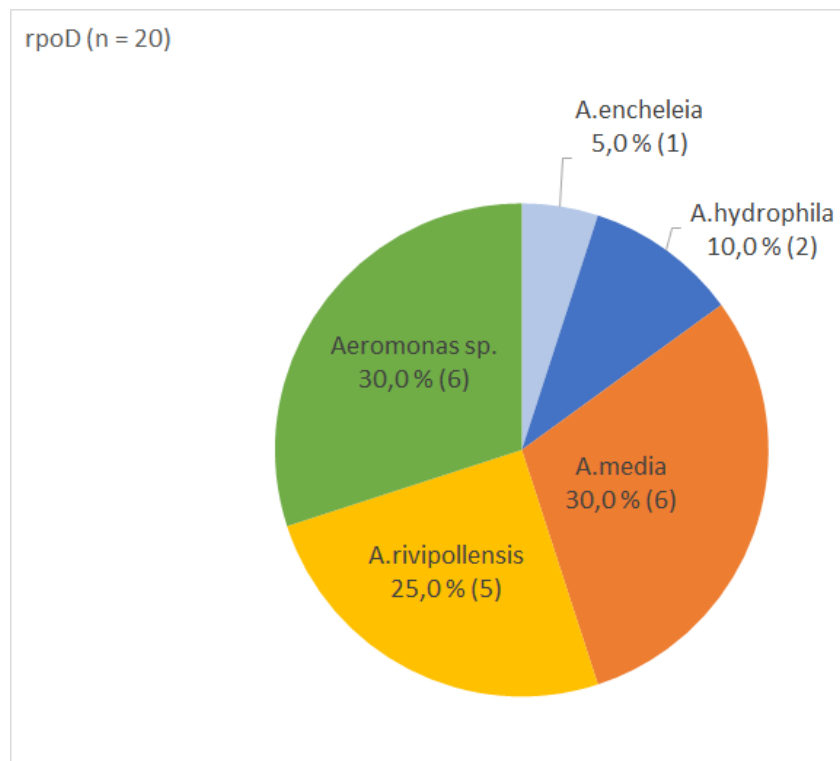
Figur 4: Fordeling av arter presumptivt identifisert gjennom BLAST basert på *gyrB*-sekvensene fra tidligere forsøk. Antall isolater $n=70$, hvorav 82,9% (58 isolater) ble identifisert som *A. media*, 1 isolat (1,4%) ble identifisert som *A. salmonicida*, 1 isolat (1,4%) ble identifisert som *A. hydrophila* og CCUG14551 ble korrekt identifisert som *A. hydrophila* ATCC 7966. Øvrige 9 isolater (12,9%) ble identifisert som *Aeromonas* på slektsnivå.

For *radA*-sekvensene ble hovedandelen identifisert som *A. rivipollensis* (55 isolater, 79,7%) og 12 isolater (17,4%) identifisert som *A. media* (Figur 5).



Figur 5: Fordeling av arter presumptivt identifisert gjennom BLAST basert på *radA*-sekvensene isolert i dette forsøket. Antall isolater $n=69$, hvorav 55 isolater (79,7%) ble identifisert som *A. rivipollensis*, 12 isolat (17,4%) identifisert som *A. media*, 1 isolat (1,4%) ble identifisert som *A. salmonicida* og CCUG14551 ble korrekt identifisert som *A. hydrophila* ATCC 7966.

Sekvensering av 20 isolater *rpoD* identifiserte 6 isolater som *A. media* og 5 isolater som *A. rivipollensis* (Figur 6).



Figur 6: Fordeling av arter presumptivt identifisert gjennom BLAST basert på *rpoD*-sekvensene. Antall isolater $n=20$, hvorav 6 isolater (30%) ble identifisert som *A. media*, 5 isolat (25%) ble identifisert som *A. rivipollensis*, 2 isolat (10%) ble identifisert som *A. encheleia* og 1 isolat (5%) ble identifisert som *A. hydrophila*. Øvrige 12 isolater (17,4%) ble identifisert som *Aeromonas* på slektsnivå.

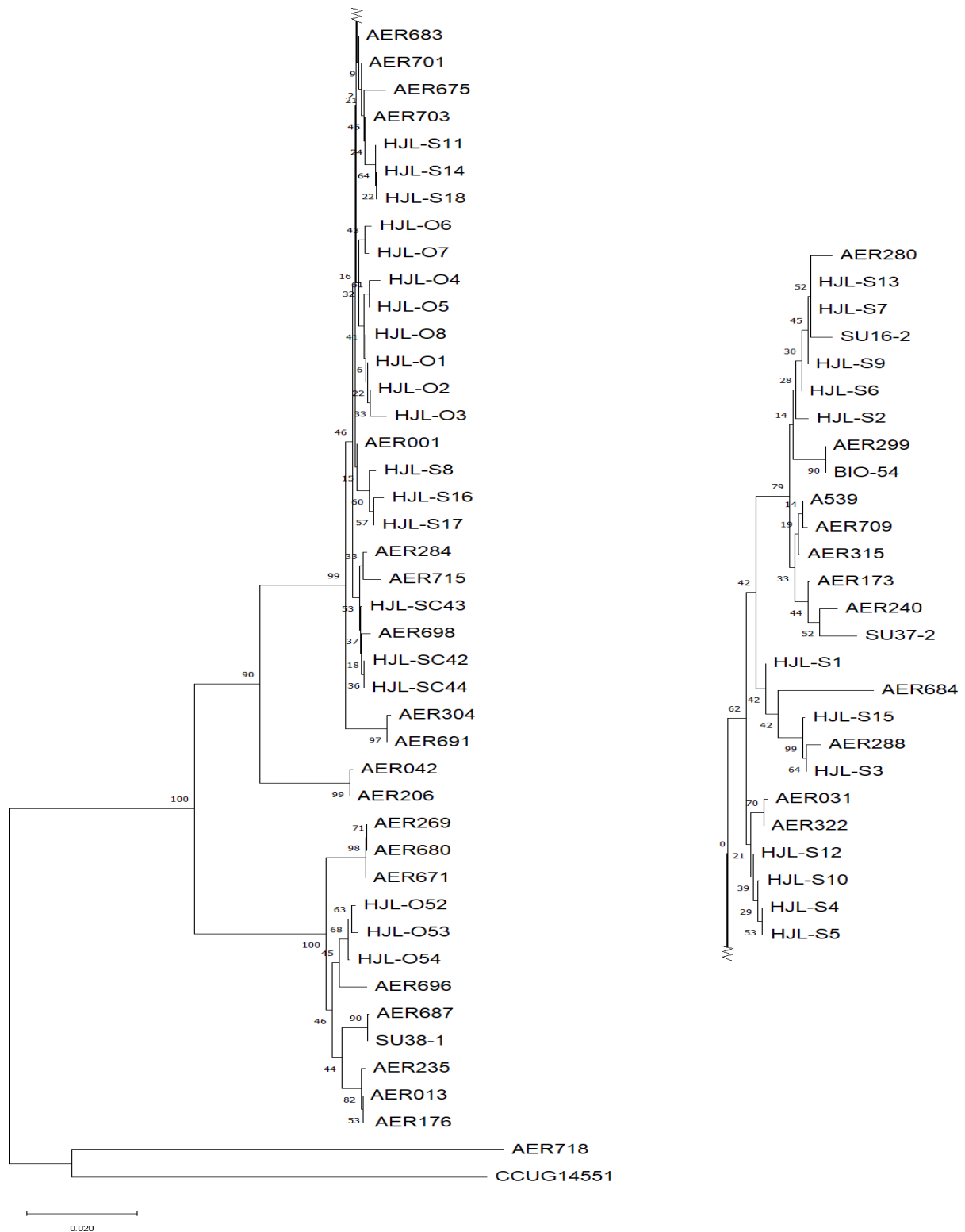
4.4 Fylogenetisk analyse

Fylogenetiske trær ble bygget med sekvenssammenligning av de enkelte nukleotidsekvenser fra *radA* (Figur 7), *gyrB* (Figur 8), konkatenererte sekvenser av *radA* og *gyrB* (Figur 9) og konkatenererte sekvenser av 3 husholdningsgener *radA*, *gyrB* og *rpoD* (Figur 10). Felles for alle trærne var at AER718 (identifisert som *A. salmonicida* i BLAST-søk med både *radA*- og *gyrB*-sekvensen) og CCUG14551 (referansestamme for *A. hydrophila*) ble separert fra de andre isolatene i treet som funksjonen til en utgruppe er.

Treet i Figur 7 benyttet 69 *radA*-sekvenser for å bygge et neighbor-joining tre over 1000 bootstrapsykluser. På treet var det mulig å identifisere 4 hovedklynger med bootstrapverdier på 99-100%. Den første klyngen (100% bootstrapverdi) bestod av 12 isolater, hvorav 4 var isolert fra sjømatprodukter og 8 fra salatprodukter. Samtlige *radA*-sekvenser fra klynge 1 var identifisert som *A. media* i BLAST-søk. Innad i første klynge var det også tre isolater (AER269, AER680 og AER671) klynget sammen med en bootstrapverdi på 99% og lav genetisk variasjon.

I andre klynge (90% bootstrapverdi) var det to isolater (AER042 og AER206). Begge fra salatprodukter, og begge identifisert som *A. rivipollensis* gjennom BLAST-søk.

Den tredje og største klyngen (99% bootstrapverdi) bestod av 53 arter isolert fra både salat- og sjømatprodukter. En underklynge (97% bootstrapverdi) inneholdt isolatene AER304 og AER691, begge fra salat og identifisert som *A. rivipollensis* med BLAST. En annen underklynge på to isolater, AER299 og BIO-54 (90% bootstrapverdi), hadde blitt identifisert som *A. rivipollensis*. Resten av tredje hovedklynge bestod av 51 isolater identifisert som *A. media* eller *A. rivipollensis* gjennom BLAST.



Figur 7: Fylogenetisk tre fra 69 nukleotidsekvenser fra genet radA. Figuren viser det optimale treet, basert på Neighbor-Joining-metoden (Saitou & Nei, 1987). Tallet ved knutepunkt indikerer Bootstrap-verdier i prosent (1000 replikater) (Felsenstein, 1985) Evolusjonær distanse er basert på Kimura 2-parametermetoden (Kimura, 1980). Analysen er utført i MEGA X (Kumar et al., 2018). Horisontal avstand indikerer genetisk variasjon og målestokken viser avstanden for at 2 av 100 nukleotidbaser er ulike.

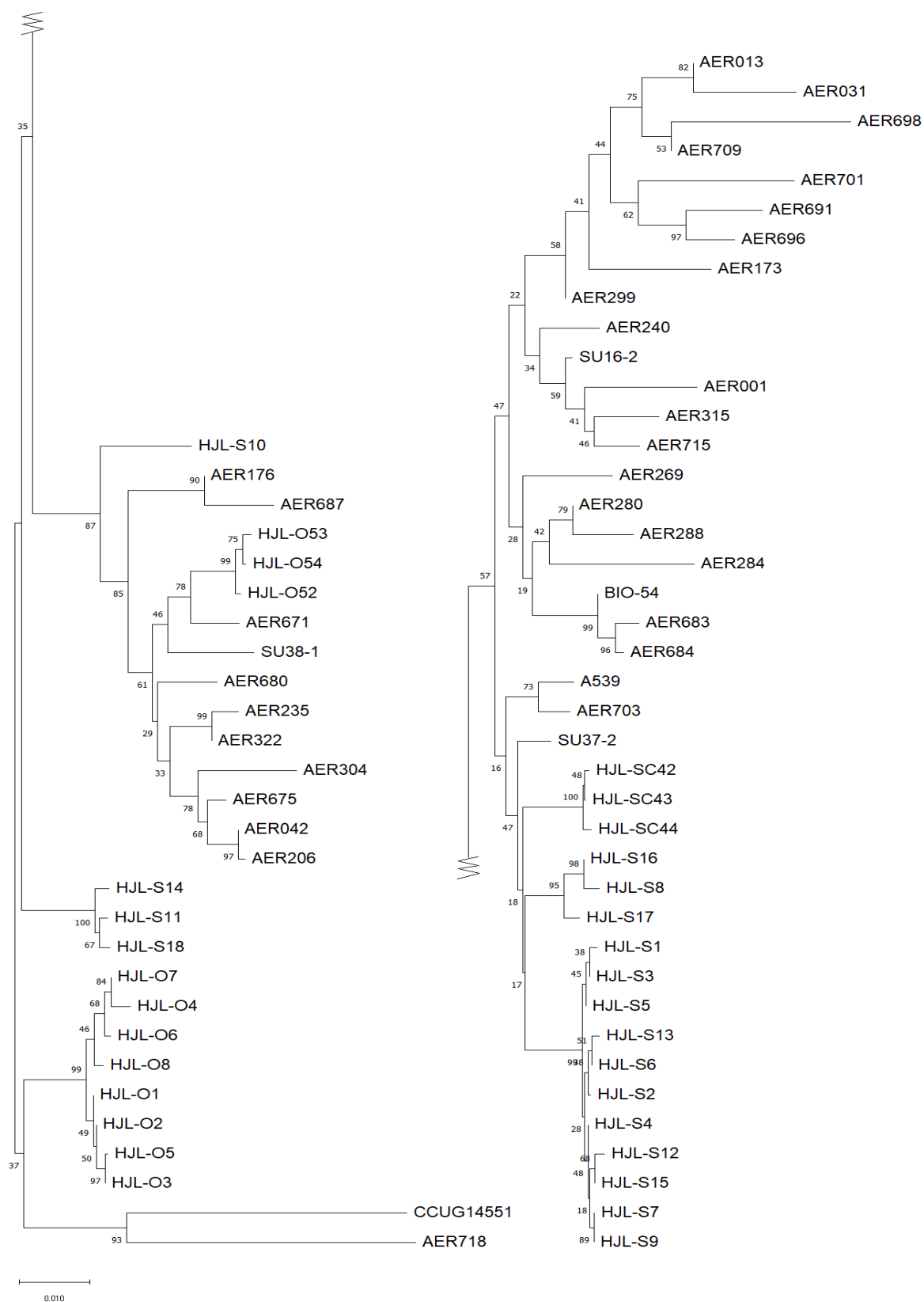
GyrB-sekvenser fra 69 isolater (31 isolater fra salat, 37 fra sjømat) ble parvis sammenlignet og et neighbor-joining tre ble konstruert (Figur 8) med 4 hovedklynger med bootstrapverdier mellom 57-100%.

Første klynge (99% bootstrapverdi) bestod av 8 isolater (HJL-O1 – HJL-O8), alle isolert fra østers og alle identifisert som *A. media* i BLAST.

Andre klynge (100% bootstrapverdi) bestod av 3 isolater isolert fra sushi (HJL-S11, HJL-S14 og HJL-S18). Søk i BLAST hadde identifisert isolatene som *A. media*.

I klynge 3 (87% bootstrapverdi) var det 15 isolater, hvorav 10 var fra salatprodukter og 5 fra sjømat. 6 av isolatene (AER042, AER176, AER235, AER322, AER687 og SU38-1) var identifisert som *A. media* i BLAST-databasen, og øvrige isolater var identifisert til *Aeromonas sp.* til slektsnivå.

Klynge 4 var den største klyngen (57% bootstrapverdi), med 41 isolater fra isolert fra både salatprodukter og sjømat. En større underklynge bestående av 10 isolater (99% bootstrapverdi), alle isolater fra sushi (HJL-S1, S2, S3, S4, S5, S6, S7, S9, S12, S13 og S15). var alle identifisert som *A. media* gjennom BLAST. Resten av nukleotidsekvensene i fjerde klynge var blitt isolert fra salat eller sjømat og blitt identifisert som *A. media*, *A. hydrophila* eller *Aeromonas* på slektsnivå.



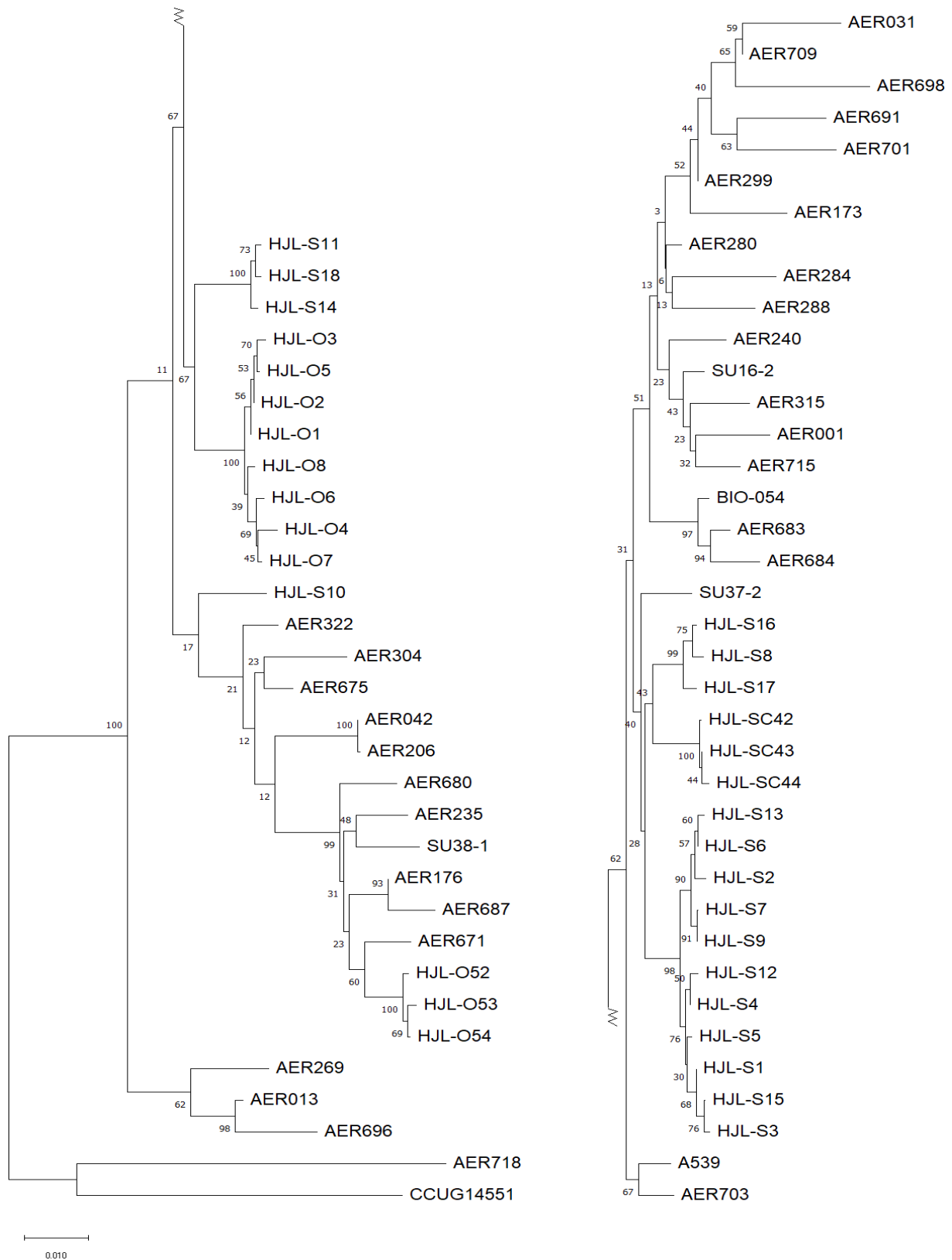
Figur 8 Fylogenetisk tre fra 69 nukleotidsekvenser fra genen *gyrB*. Figuren viser det optimale treet, basert på Neighbor-Joining-metoden (Saitou & Nei, 1987). Tallet ved knutepunkt indikerer Bootstrap-verdier i prosent (1000 replikater) (Felsenstein, 1985). Evolusjonær distanse er basert på Kimura 2-parametermetoden (Kimura, 1980). Analysen er utført i MEGA X (Kumar et al., 2018). Horizontal avstand indikerer genetisk variasjon og målestokken viser avstanden for at 1 av 100 nukleotidbaser er ulike.

Neighbor-joining tre konstruert av 69 konkatenererte *radA*- og *gyrB*-sekvenser (Figur 9) viste 3 hovedklynger ved bootstrapverdier >60%.

En gruppe bestående av 3 isolater (AER269, AER 013 og AER696), alle isolater fra salat identifisert som *A. media* med BLAST for både *radA* og *gyrB* (62% bootstrapverdi).

Andre hovedklynge (67% bootstrapverdi) var videre delt i to underklynger. Første underklynge bestod av 8 isolater fra østers (HJL-O1 til HJL-O8). BLAST-resultatene for *radA* identifiserte alle isolatene som *A. rivipollensis*, men for *gyrB* ble de identifisert som *A. media*. Den andre underklyngen (100% bootstrap) bestod av tre isolater fra sushi (HJL-S11, HJL-S18 og HJL-S14). Disse var også identifisert som *A. rivipollensis* med *radA*, og *A. media* med *gyrB*.

Den tredje og største hovedklyngen (62% bootstrapverdi) var bestående av 38 isolater fra både salat og sjømat. To underklynger var bestående av kun sushi-isolater (98% og 99% bootstrapverdi), en underklynge kun kamskjell (100% bootstrapverdi).



Figur 9 Fylogenetisk tre fra sammensatte nukleotidsekvenser fra genene radA og gyrB. Figuren viser det optimale treet, basert på Neighbor-Joining-metoden (Saitou & Nei, 1987). Tallet ved knutepunkt indikerer Bootstrap-verdier i prosent (1000 replikater) (Felsenstein, 1985) Evolusjonær distanse er basert på Kimura 2-parametermetoden (Kimura, 1980). Analysen er utført i MEGA X (Kumar et al., 2018). Horisontal avstand indikerer genetisk variasjon og målestokken viser avstanden for at 1 av 100 nukleotidbaser er ulike.

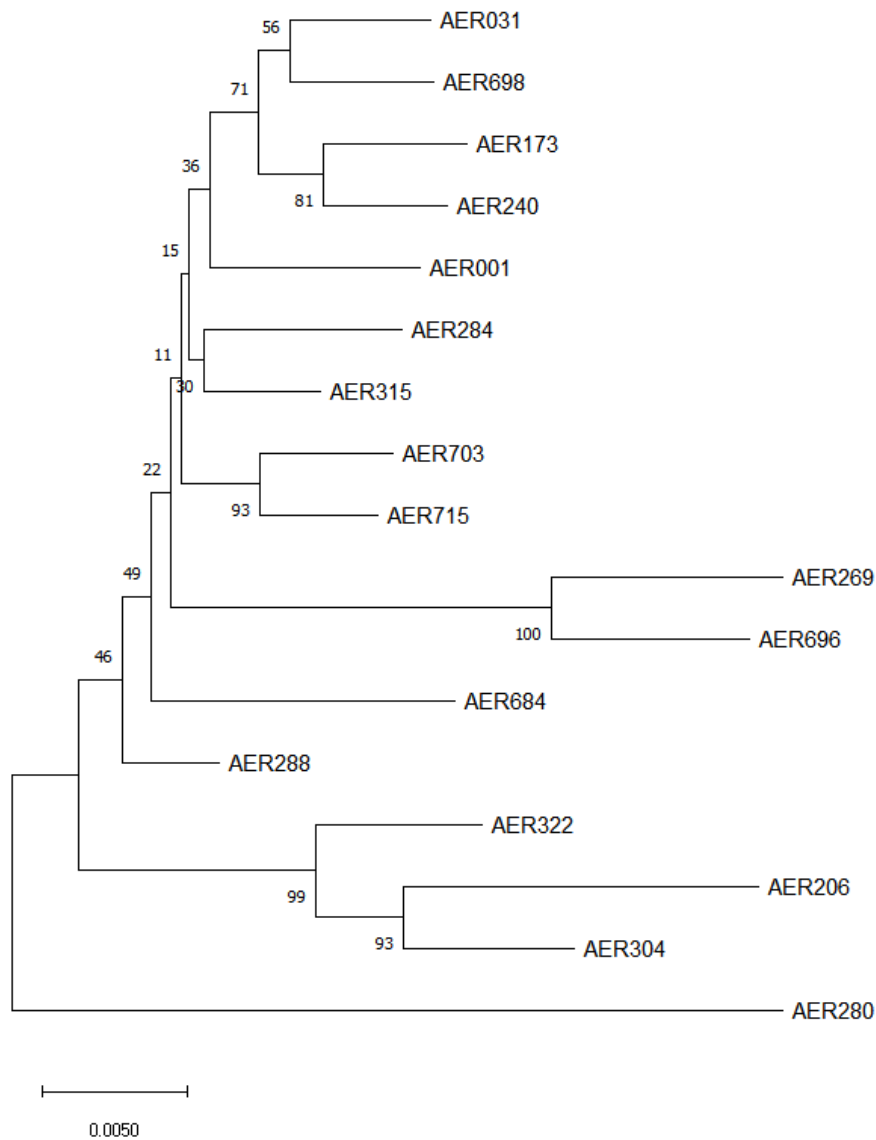
Sammensatte sekvenser av 17 *radA*-, *gyrB*- og *rpoD*-gen dannet et fylogenetisk tre med flere små klynger med bootstrapverdier >60% (Figur 10). Alle isolatene i dette treet var fra salat.

AER280 som dannet en utstikker, hadde blitt identifisert som både *A. rivipollensis* for *radA*, *A. media* for *gyrB* og *A. encheleia* for *rpoD*.

AER173 og AER240 ble gruppert sammen med en bootstrapverdi på 81%. Begge var identifisert som *A. rivipollensis* med *radA* og *A. media* med *gyrB*. Med *rpoD* var de identifisert som henholdsvis *A. hydrophila* og *A. media*.

AER703 og AER715 dannet en klynge med 93% bootstrapverdi. Begge identifisert som *A. rivipollensis* med *radA* og *A. media* med *gyrB*. Ved identifisering med *rpoD* ble 703 identifisert som *Aeromonas* på slektsnivå, imens AER 715 ble identifisert som *A. hydrophila*.

En siste klynge med 99% bootstrapverdi bestod av AER322 med underklyngen AER206 og AER304 (93% bootstrapverdi). Alle tre isolater var identifisert som *A. rivipollensis* med *radA* og *A. media* med *rpoD*. *GyrB* identifiserte AER206 og AER304 til *Aeromonas* på slektsnivå, og AER322 ble identifisert som *A. media*.



Figur 10 Fylogenetisk tre fra sammensatte (konkatenerte) nukleotidsekvenser fra genene radA, gyrB og rpoD. Figuren viser det optimale treet, basert på Neighbor-Joining-metoden (Saitou & Nei, 1987). Tallet ved knutepunkt indikerer Bootstrap-verdier i prosent (1000 replikater) (Felsenstein, 1985). Evolusjonær distanse er basert på Kimura 2-parametermetoden (Kimura, 1980). Analysen er utført i MEGA X (Kumar et al., 2018). Horizontal avstand indikerer genetisk variasjon og målestokken viser avstanden for at 5 av 1000 nukleotidbaser er ulike.

5 Diskusjon

5.1 Dyrking og inkubasjon

Etter inntil 48 timer inkubering fikk 76 av 94 isolater påvist vekst i to omganger. De isolatene det ikke ble påvist vekst hos hadde vært lagret i 9 år siden 2012, og hadde i tillegg vært del inkludert i andre forsøk i mellomtiden. Blant annet tidligere forsøk kan ha medført nok stress i kulturene gjennom varierende temperaturer til at de hadde nedsatt overlevelsessevne og dermed ikke tålte ytterligere håndtering under våre forsøk. Lagringsforhold og cellestabilitet er blitt kommentert av (Gao & Critser, 2000). Ved forsøkene på å dyrke de 18 isolatene i TSB ble det ikke observert vekst, og det ble dermed konkludert at vi ikke klarte å fremme vekst hos disse isolatene. For isolat AER695 ble det påvist vekst ved første dyrking, men det ble notert at koloniene var mindre enn forventet basert på koloniene fra andre isolater. Da den ble forsøkt dyrket på nytt var det ingen vekst å registrere.

5.2 DNA-ekstraksjon, PCR og sekvensering

Uten særlig erfaring med DNA-ekstraksjon var det usikkert hvor mye biologisk materiale det var riktig å hente ut fra TSA-skålene, noe som resulterte i stor variasjon for DNA-konsentrasjonene etter ekstraksjon. De høye konsentrasjonene kan ha vært medvirkende til at båndene ved gelelektroforese så kortere ut enn forventet av primerparene som ble benyttet. Alle PCR-produkter med samme primer hadde uansett konsekvente båndlengder, så det var grunnlag for å anta at de amplifiserte de samme genene fra alle isolater. Forskjellen i utbytte ble utlignet ved fortykning etter rensing av PCR-produktet, så de høye konsentrasjonene før PCR burde ikke påvirke kvaliteten på sekvensene i særlig grad.

Etter sekvensering fikk vi bekreftet at kvaliteten på PCR-produktene generelt var god, med kun 4 av 95 isolater som ikke lot seg sekvensere, og uten behov for å klippe bort store deler av sekvensene før videre analyse. Unntaket var *radA*-sekvensen fra AER655 hvor den avleste sekvensen ble kuttet fra 511 til 271 basepar for å utelukke basene med lav sikkerhet. Det ble derfor avgjort å ikke inkludere den i videre analyse.

5.3 Identifikasjon

Databasesammenligning i BLAST av sekvenser for gen *radA* identifiserer kun 17,4% av det totale antallet isolater som *A. media* (Figur 5). I studiene til Hoel et al. (2017), Lee et al. (2020) og Umutomi et al. (2020) ble en stor del av disse isolatene identifisert som *A. media*.

Det er derfor overraskende at andelen som blir identifisert som *A. media*, er så liten. Majoriteten av isolatene er nå identifisert som *A. rivipollensis*, som ikke tidligere har blitt påvist blant de aktuelle isolatene.

Sekvenser med genet *gyrB*, i en oppdatert sammenligning med databasen (Figur 4), identifiserte en majoritet på 82,9% av totalt antall isolater som *A. media*. Dette var som forventet, ettersom lignende søk ble utført senest i 2019. Ingen av isolatene ble identifisert som *A. rivipollensis*, hverken i dette eller tidligere databasesøk. Ett isolat, AER173 som tidligere ble identifisert som *A. media*, ble denne gangen identifisert som *A. hydrophila* (ID:96,68%) Et annet isolat, AER315, som tidligere var identifisert som *A. hydrophila*, ble nå identifisert som *A. media* (ID:97,19%) basert på match med en nyere sekvens.

Av 20 sekvenser med *rpoD* var andelen isolater påvist som *A. media* 30%, men her er det også identifisert *A. rivipollensis* i 25% av tilfellene (Figur 6). Her identifiseres også ett isolat som *A. encheleia*, som ikke forekommer ved BLAST-søk ved hverken *radA*- eller *gyrB*-sekvensene.

Sammenlignes utfyllende data for BLAST-søkene med genene *radA*, *gyrB* og *rpoD* (Vedlegg 2), bemerkes det at isolatene SU-162, SU37-2, SU38-1, BIO-O54 og A539 tidligere er lagt inn med *gyrB*-sekvenser i databasen Genbank som *A. media*. En ville forvente at disse skulle blitt identifisert som *A. media* også ved bruk av *radA*. Dette er ikke tilfelle, kun isolatet SU38-1 blir identifisert som *A. media*, de resterende som *A. rivipollensis*.

Det fylogenetiske treet basert på *radA* (Figur 7) viser en klar avgrensning mellom referanseprøven CCUG14551 *A. hydrophila*, AER718 *A. salmonicida* og de resterende isolatene. En observerer også at det er et skille mellom isolater identifisert som *A. media*, og isolater identifisert som *A. rivipollensis* på den andre siden. Det bemerkes at isolatene HJL-O52, O53 og O54 danner en egen klynge blant grupperingen identifisert som *A. media*. Disse tre ble identifisert som *A. sp* med *gyrB*-sekvensen.

I det fylogenetiske treet basert på data fra *gyrB* (Figur 8) vises det også her klar avgrensning mellom referanseprøven CCUG14551 *A. hydrophila*, AER718 *A. salmonicida* og mellom resten av isolatene. Vi bemerker at AER173, som i BLAST-søket med *gyrB* ble identifisert som *A. hydrophila*, ikke grupperer seg sammen med referansen, og dermed trekkes det i tvil at AER173 er riktig identifisert. Ellers observeres det at det er en tendens til at isolatene grupperer seg etter type vert de er isolert fra, eksempelvis SC42-43, HJL-O1-O8 og HJL-O52-54. Disse er isolert fra skalldyr og østers.

Talagrand-Reboul et al. (2017) observerer at differensieringen av *Aeromonas media* og de nært beslektede artene tilsynelatende foregår ut fra generelle kjemiske og fysiske miljøforhold, og ikke som tilpasning til vertsorganismer. Videre følger at vann og sedimenter er primærhabitat for *A.media* som ble studert, og funn i vannlevende organismer antagelig er opportun adferd.

Det hadde dermed vært interessant å ha mer informasjon om fangststed for noen av sjømatproduktene, samt område hvor salatisolatene ble dyrket, og undersøke om det finnes noe geografisk mønster.

I det sammenstilte treet med sekvenser fra både *gyrB* og *radA* (Figur 9) er det igjen klar avgrensning mellom referansen, AER718 og resten av populasjonen. Isolat AER269, AER013 og AER696, som alle er identifisert som *A.media* med både *radA* og *gyrB* ser ut til å danne en egen gruppe. Bootstrapverdi i knutepunktet er 62%. Lee et al. (2020) bemerker at kun verdier over 70% vanligvis vil tilsi høyere enn 95% sannsynlighet for at en slik fylogeni er ekte. Derfor trekkes denne grupperingen i tvil.

I det sammenstilte treet med genene *radA*, *gyrB* og *rpoD* (Figur 10) er ikke sekvensene for referansestammen med, så vi kan ikke trekke noen slutninger over hvorvidt sammenstillingen evner å avgrense de utvalgte isolatene. Det observeres likevel at AER280, (*A.enceheleia* ved *rpoD*, *A.media*. ved *gyrB* og *A.rivipollensis* ved *radA*), grupperes separat.

Hvis vi ser på *kun* identifikasjon av isolater med gen *radA* i sammenheng med det fylogenetiske treet basert på *radA*, er det lett å argumentere for at denne identifikasjonen er riktig – i det fylogenetiske treet er det en separasjon mellom isolater identifisert som *A.media* og isolater identifisert som *A.rivipollensis*.

På samme måte kan det lett argumenteres for at det fylogenetiske treet basert på *gyrB* understøtter identifikasjonen av isolater basert på *kun gyrB*-sekvens. Her er majoriteten identifisert som *A.media*, og det er klar avgrensning til referansestammen *A.hydrophila* og den beslektede *A.salmonicida*. Det er vanskelig å forestille seg at begge deler er riktig.

Hvis vi ser på *A.rivipollensis*, så er dette en art som ble beskrevet av Marti & Bálcazar (2015), der det ble funnet at arten delte 99,4% av genmaterialet i 16S rRNA med sin nærmest beslektede art *A.media*. Arten ble senere korrigeret av Talagrand-Reboul et al. (2017), som påpekte at den viktigste fenotypiske forskjellen mellom artene *A.media* og *A.rivipollensis* er at *A.rivipollensis* ikke produserer DL-laktat og er sårbar for cefoxitin. Forfatterne slår videre fast

at for å lage en fylogenetisk struktur med liten grad av usikkerhet, trengs en stor mengde genetisk informasjon. Dette gjelder spesielt for *Aeromonas* arter som er nært beslektet.

Talagrand-Reboul et al. (2017) påpeker videre at *gyrB* og *radA* i kombinasjon er en effektiv måte å separere *A.rivipollensis* fra *A.media* og andre *Aeromonas*-arter.

Vi observerer ingen klar separasjon, med unntak av referansestamme og *A.salmonicida*. Det hadde derfor vært interessant å bygge et nytt fylogenetisk tre og inkludere en referanseprøve av *A.rivipollensis*, evt. søke i Genbank etter passende sekvens.

Genbank, databasen som ble benyttet for å utføre sammenligning av sekvenser, er en åpen, brukerstyrt database. Clarridge (2004) påpeker at Genbank er en database som har registrert gensekvenser siden 1990-tallet, og at en del av sekvensmaterialet er feilklassifisert.

Eksempelvis kommenterer Teunis & Figueras (2016) at det har vist seg at opptil 30% av genomsekvenser registrert som *A.hydrophila* har vist seg å være feil, noe som er interessant med tanke på at isolat AER173 ble identifisert som *A.hydrophila* ved oppdatert søk for *gyrB*-sekvenser.

Vi observerer også at sekvenslengde for *radA* ligger høyere enn spesifisert av Roger et al.(2012), som angir 405-414bp. Det kan tenkes at dette vil forskyve resultatet for identifisering, siden størrelsen på sekvensen som skal sammenlignes blir større enn sekvensen som er i databasen. Videre gir mange av søkene med *radA*-sekvenser treff på helgenomsekvenser, der resultatene ofte er veldig like for match med både *A.rivipollensis*, *A.media*, og *A.hydrophila*.

6 Konklusjon

I denne bacheloroppgaven ble det gjennomført en populasjonsstudie av 93 fra isolater fra sushi, salat, sjømat og skalldyr. Isolatene hadde tidligere blitt identifisert som *Aeromonas media*, men det var knyttet en viss usikkerhet til identifiseringen. Isolatene hadde vært lagret på -80°C. Oppdyrking var vellykket for 76 isolater.

Isolatene ble inkubert ved 37°C. Det ble foretatt DNA-ekstraksjon og PCR-amplifikasjon av husholdningsgenene *radA* og *rpoD*. PCR-produkter ble visualisert ved gelelektroforese.

PCR-produkter ble sekvensert ved Eurofins Genomics.

70 sekvenser for *radA*, 69 tidligere sekvenser for *gyrB* og 20 sekvenser for *rpoD* ble identifisert ved søk i Genbank, og det ble konstruert fylogenetiske trær av enkeltgener og sammensatte gensekvenser.

Databasesøk identifiserte 79,7% av *radA*-sekvensene som *A.rivipollensis*, og 82,9% av *gyrB*-sekvensene som *A.media*. 25% av *rpoD*-sekvensene ble identifisert som *A.rivipollensis*, 30% som *A.media* og 30% som *Aeromonas.sp.*

Fylogenetisk analyse viste at gen *radA* kan skille mellom *A.hydrophila*, *A.salmonicida* og isolatpopulasjonen. Gen *gyrB* kan også skille mellom *A.hydrophila*, *A.salmonicida* og isolatpopulasjonen. Fylogenetisk tre for sammensatte gener *radA* og *gyrB* skiller ut *A.hydrophila* og *A.salmonicida*, men det observeres ikke noen åpenbar separasjon av isolater identifisert som *A.rivipollensis*.

Dette kombinert med en viss usikkerhet rundt søk i Genbank, peker på at en identifisering av en majoritet av isolatene som *A.rivipollensis*, er lite trolig.

7 Forslag til videre arbeid

For å undersøke om kombinasjonen av genene *radA* og *gyrB* klarer å separere *A.media* og *A.rivipollensis*, er det nærliggende å gjenta forsøket med en referansestamme av *A.rivipollensis*, eller å bygge et fylogenetisk tre med egnede gener hetet fra Genbank. Et noe mer ressurskrevende prosjekt kunne være en multilokusanalyse (MLPA) av isolatene.

8 Referanser

- Ali, A.; Carnahan, A.; Altwegg, M.; Luthy-Hottenstein, J.; Josep, S. . (1996). *Aeromonas bestiarum* sp. nov. (formely genomospecies DNA group 2 *Aeromonas hydrophila*), a new species isolated from non human sources. *Med. Microbiol. Lett.*, (5), 156–165.
- Allen, D. A., Austin, B., & Colwell, R. . (1983). *Aeromonas media*, a New Species Isolated from River Water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 33(3), 599–604. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-33-3-599>
- Alperi, A., Martínez-Murcia, A. J., Ko, W.-C., Monera, A., Saavedra, M. J., & Figueras, M. J. (2010). *Aeromonas taiwanensis* sp. nov. and *Aeromonas sanarellii* sp. nov., clinical species from Taiwan. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(9), 2048–2055.
- Alperi, A., Martinez-Murcia, A. J., Monera, A., Saavedra, M. J., & Figueras, M. J. (2010). *Aeromonas fluvialis* sp. nov., isolated from a Spanish river. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(1), 72–77.
- Aravena-Roman, M., Beaz-Hidalgo, R., Inglis, T. J. J., Riley, T. V, Martinez-Murcia, A. J., Chang, B. J., & Figueras, M. J. (2013). *Aeromonas australiensis* sp. nov., isolated from irrigation water (vol 63, pg 2270, 2013). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(Pt_8), 3130.
- Beaz-Hidalgo, R, Alperi, A., Figueras, M. J., & Romalde, J. L. (2009). *Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish. *Systematic and applied microbiology*, 32(7), 471–479.
- Beaz-Hidalgo, R, Latif-Eugenín, F., Hossain, M. J., Berg, K., Niemi, R. M., Rapala, J., ... Figueras, M. J. (2015). *Aeromonas aquatica* sp. nov., *Aeromonas finlandiensis* sp. nov. and *Aeromonas lacus* sp. nov. isolated from Finnish waters associated with cyanobacterial blooms. *Systematic and applied microbiology*, 38(3), 161–168.
- Beaz-Hidalgo, Roxana, Martínez-Murcia, A., & Figueras, M. J. (2013). Reclassification of *Aeromonas hydrophila* subsp. *dhakensis* Huys et al. 2002 and *Aeromonas aquariorum* Martínez-Murcia et al. 2008 as *Aeromonas dhakensis* sp. nov. comb nov. and emendation of the species *Aeromonas hydrophila*. *Systematic and applied microbiology*, 36(3), 171–176.
- Carnahan, A., Fanning, G. R., & Joseph, S. W. (1991). *Aeromonas jandaei* (formerly genomospecies DNA group 9 *A. sobria*), a new sucrose-negative species isolated from

- clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(3), 560–564. Hentet fra <https://jcm.asm.org/content/29/3/560>
- Carnahan, A. M., Chakraborty, T., Fanning, G. R., Verma, D., Ali, A., Janda, J. M., & Joseph, S. W. (1991). *Aeromonas trota* sp. nov., an ampicillin-susceptible species isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(6), 1206–1210.
- Clarridge III, J. E. (2004). Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 840–862.
- Dallaire-Dufresne, S., Tanaka, K. H., Trudel, M. V, Lafaille, A., & Charette, S. J. (2014). Virulence, genomic features, and plasticity of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida*, the causative agent of fish furunculosis. *Veterinary microbiology*, 169(1–2), 1–7.
- Demarta, A., Küpfer, M., Riegel, P., Harf-Monteil, C., Tonolla, M., Peduzzi, R., ... Martínez-Murcia, A. (2008). *Aeromonas tecta* sp. nov., isolated from clinical and environmental sources. *Systematic and applied microbiology*, 31(4), 278–286.
- Doyle, M. P., Diez-Gonzalez, F., & Hill, C. (2019). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. I *Food Microbiology*. Newark: ASM Press.
- Esteve, C., Gutiuréz, M. C., & Ventosa, A. (1995). *Aeromonas encheleia* sp. nov., Isolated from European Eels. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(3), 462–466. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00207713-45-3-462>
- Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M. C., & Green, P. (1998). Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8(3), 175–185. <https://doi.org/10.1101/gr.8.3.175>
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791.
- Fernández-Bravo, A., & Figueras, M. J. (2020). An Update on the Genus *Aeromonas* : Taxonomy, Epidemiology, and Pathogenicity. *Microorganisms (Basel)*, 8(1), 129.
- Figueras, M J, Alperi, A., Beaz-Hidalgo, R., Stackebrandt, E., Brambilla, E., Monera, A., & Martínez-Murcia, A. J. (2011). *Aeromonas rivuli* sp. nov., isolated from the upstream region of a karst water rivulet. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 61(2), 242–248.
- Figueras, M J, Latif-Eugenín, F., Ballester, F., Pujol, I., Tena, D., Berg, K., ... Liles, M. R. (2016). ‘*Aeromonas intestinalis*’ and ‘*Aeromonas enterica*’ isolated from human faeces,

- ‘*Aeromonas crassostreae*’ from oyster and ‘*Aeromonas aquatilis*’ isolated from lake water represent novel species. *New microbes and new infections*, 15(C), 74–76.
- Figueras, Ma. José, Aldea, M. J., Fernández, N., Aspíroz, C., Alperi, A., & Guarro, J. (2007). *Aeromonas hemolytic uremic syndrome. A case and a review of the literature. Diagnostic microbiology and infectious disease*, 58(2), 231–234.
- Gao, D., & Critser, J. K. (2000). Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR journal*, 41(4), 187–196.
- Granum, P. E., Rørvik, L. M., Aspholm, M., & Wasteson, Y. (2015). *Matforgiftning : smitte gjennom mat og vann* (4. utg., s. 57–64). 4. utg., s. 57–64. Oslo: Cappelen Damm akademisk.
- Griffin, P. ., Sniezko, S. F., & Friddle, S. B. (1953). Pigment formation by *Bacterium salmonicida*. *Journal of Bacteriology*, 65(6), 652–659.
<https://doi.org/10.1128/JB.65.6.652-659.1953>
- Harf-Monteil, C., Fleche, A. Le, Riegel, P., Prevost, G., Bermond, D., Grimont, P. A. D., & Monteil, H. (2004). *Aeromonas simiae* sp. nov., isolated from monkey faeces. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(2), 481–485.
- Harrison, T. R., & Fauci, A. S. (2008). *Harrison’s principles of internal medicine* (17th ed. e). New York: McGraw-Hill.
- Hickman-Brenner, F. W., Fanning, G. R., Arduino, M. J., Brenner, D. J., & Farmer, J. J. I. I. I. (1988). *Aeromonas schubertii*, a new mannitol-negative species found in human clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 26(8), 1561–1564.
- Hickman-Brenner, F. W., MacDonald, K. L., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., & Farmer III, J. J. (1987). *Aeromonas veronii*, a new ornithine decarboxylase-positive species that may cause diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 25(5), 900–906.
- 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(MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00931>
- Hoel, S., Vadstein, O., & Jakobsen, A. N. (2019). The Significance of Mesophilic *Aeromonas* spp. in Minimally Processed Ready-to-Eat Seafood. *Microorganisms (Basel)*, 7(3), 91.
- Huys, G., Kämpfer, P., Altwegg, M., Kersters, I., Lamb, A., Coopman, R., ... Kersters, K. (1997). *Aeromonas popoffii* sp. nov., a mesophilic bacterium isolated from drinking water production plants and reservoirs. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47(4), 1165–1171. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-4-1165>
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and

- Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(1), 35–73.
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of molecular evolution*, 16(2), 111–120.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Lee, H. J., Hoel, S., Lunestad, B. T., Lerfall, J., & Jakobsen, A. N. (2020). *Aeromonas* spp. isolated from ready-to-eat seafood on the Norwegian market: prevalence, putative virulence factors and antimicrobial resistance. *Journal of Applied Microbiology*.
<https://doi.org/10.1111/jam.14865>
- Marti, E., & Balcázar, J. L. (2015). *Aeromonas rivipollensis* sp. nov., a novel species isolated from aquatic samples. *Journal of basic microbiology*, 55(12), 1435–1439.
- Martin-Carnahan, A., & Joseph, S. W. (2005). *Aeromonadales* ord. nov. I D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley, G. M. Garrity, D. R. Boone, P. De Vos, ... K.-H. Schleifer (Red.), *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two The Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria* (s. 556–587). Boston, MA: Springer US.
https://doi.org/10.1007/0-387-28022-7_12
- Martínez-Murcia, A., Beaz-Hidalgo, R., Navarro, A., Carvalho, M. J., Aravena-Román, M., Correia, A., ... Saavedra, M. J. (2016). *Aeromonas lusitana* sp. nov., Isolated from Untreated Water and Vegetables. *Current microbiology*, 72(6), 795–803.
- Martínez-Murcia, A. J., Soler, L., Saavedra, M. J., Chacón, M. R., Guarro, J., Stackebrandt, E., & Figueras, M. J. (2005). Phenotypic, genotypic, and phylogenetic discrepancies to differentiate *Aeromonas salmonicida* from *Aeromonas bestiarum*. *International microbiology*, 8(4), 259–269.
- Martínez-Murcia, A., Martínez-Murcia, A., Beaz-Hidalgo, R., Beaz-Hidalgo, R., Svec, P., Svec, P., ... Sedlacek, I. (2013). *Aeromonas cavernicola* sp. nov., isolated from fresh water of a brook in a cavern. *Current microbiology*, 66(2), 197–204.
- Martinez-Murcia, A J, Esteve, C., Garay, E., & Collins, M. D. (1992). *Aeromonas allosaccharophila* sp. nov., a new mesophilic member of the genus *Aeromonas*. *FEMS microbiology letters*, 70(3), 199–205.
- Martinez-Murcia, Antonio J, Monera, A., Saavedra, M. J., Oncina, R., Lopez-Alvarez, M., Lara, E., & Figueras, M. J. (2011). Multilocus phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas*. *Systematic and applied microbiology*, 34(3), 189–199.

- Minana-Galbis, D., Farfan, M., Fuste, M. C., & Loren, J. G. (2004). *Aeromonas molluscorum* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(6), 2073–2078.
- Minana-Galbis, D., Farfan, M., Fuste, M. C., & Loren, J. G. (2007). *Aeromonas bivalvium* sp. nov., isolated from bivalve molluscs. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(3), 582–587.
- Minana-Galbis, D., Farfan, M., Gaspar Loren, J., & Carmen Fuste, M. (2010). Proposal to assign *Aeromonas diversa* sp. nov. as a novel species designation for *Aeromonas* group 501. *Systematic and applied microbiology*, 33(1), 15–19.
- Nagar, V., Shashidhar, R., & Bandekar, J. R. (2013). Characterization of *Aeromonas* strains isolated from Indian foods using rpoD gene sequencing and whole cell protein analysis. *World journal of microbiology & biotechnology*, 29(4), 745–752.
- National Center for Biotechnology Information [NCBI]. (2021). BLAST - Basic local alignment search tool. Hentet fra <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Navarro, A., & Martínez-Murcia, A. (2018). Phylogenetic analyses of the genus *Aeromonas* based on housekeeping gene sequencing and its influence on systematics. *Journal of applied microbiology*, 125(3), 622–631.
- Nordisk metodikkomité for næringsmidler [NMKL]. (2004). *Aeromonas, mesofile arter. Bestemmelse i næringsmidler og fôr*. Oslo: NMKL.
- Pablos, M., Rodríguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A., & García-López, M.-L. (2009). Occurrence of motile *Aeromonas* in municipal drinking water and distribution of genes encoding virulence factors. *International journal of food microbiology*, 135(2), 158–164.
- Parker, J. L., & Shaw, J. G. (2010). *Aeromonas* spp. clinical microbiology and disease. *The Journal of infection*, 62(2), 109–118.
- Picão, R. C., Poirel, L., Demarta, A., Petrini, O., Corvaglia, A. R., & Nordmann, P. (2008). Expanded-spectrum β -lactamase PER-1 in an environmental *Aeromonas media* isolate from Switzerland. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(9), 3461–3462.
- Popoff, M., & Véron, M. (1976). A Taxonomic Study of the *Aeromonas hydrophila*-*Aeromonas punctata* Group. *Microbiology*, 94(1), 11–22.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1099/00221287-94-1-11>
- Roger, F., Marchandin, H., Jumas-Bilak, E., Kodjo, A., & Lamy, B. (2012). Multilocus genetics to reconstruct aeromonad evolution. *BMC microbiology*, 12(1), 62.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425.

<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>

- Schubert, R. H. W., & Hegazi, M. (1988). *Aeromonas eucrenophila* species nova *aeromonas caviae* a later and illegitimate synonym of *aeromonas punctata*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 268(1), 34–39.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-6724\(88\)80112-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0176-6724(88)80112-3)
- Soler, L., Yanez, M. A., Chacon, M. R., Aguilera-Arreola, M. G., Catalan, V., Figueras, M. J., & Martinez-Murcia, A. J. (2004). Phylogenetic analysis of the genus *Aeromonas* based on two housekeeping genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(5), 1511–1519.
- Stanier, R. Y. (1943). A Note on the Taxonomy of *Proteus Hydrophilus*. *Journal of Bacteriology*, 46(2), 213–214. <https://doi.org/10.1128/JB.46.2.213-214.1943>
- Tacão, M., Moura, A., Alves, A., Henriques, I., Saavedra, M. J., & Correia, A. (2005). Evaluation of 16S rDNA- and *gyrB*-DGGE for typing members of the genus *Aeromonas*. *FEMS microbiology letters*, 246(1), 11–18.
- Talagrand-Reboul, E., Roger, F., Kimper, J.-L., Colston, S. M., Graf, J., Latif-Eugenín, F., ... Lamy, B. (2017). Delineation of taxonomic species within complex of species: *Aeromonas media* and related species as a test case. *Frontiers in microbiology*, 8, 621.
- Teunis, P., & Figueras, M. J. (2016). Reassessment of the enteropathogenicity of Mesophilic *aeromonas* species. *Frontiers in microbiology*, 7, 1395.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673–4680.
- Umutoni, N. (2019). *Aeromonas arter fra spiseklare salatblandinger -identifisering og karakterisering av isolater*. Trondheim: NTNU. Hentet fra <http://hdl.handle.net/11250/2616823>
- Umutoni, N., Jakobsen, A. N., Mukhatov, K., Thomassen, G. M. B., Karlsen, H., & Mehli, L. (2020). Occurrence, diversity and temperature-dependent growth kinetics of *Aeromonas* spp. in lettuce. *International Journal of Food Microbiology*, 335.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108852>
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221–271.
- Yamamoto, S., & Harayama, S. (1995). PCR amplification and direct sequencing of *gyrB* genes with universal primers and their application to the detection and taxonomic

analysis of *Pseudomonas putida* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(3), 1104–1109.

Yanez, M. A., Catalan, V., Apraiz, D., Figueras, M. J., & Martinez-Murcia, A. J. (2003). Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(3), 875–883.

Vedlegg 1: Oppsummering av analyseresultater for isolatene

Isolat	Fra matvare	Referanse	Vekst	DNA (ng/μl)	radA amplikon	rpoD amplikon	radA-sekvens	rpoD-sekvens	Bemerkninger
CCUG 14551			+	22,40	+	+	+	N/A	Referansestamme <i>A. hydrophila</i>
AER 001	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	10,7	+	+	+	+	
AER 013	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	18,36	+	N/A	+	N/A	
AER 020	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 022	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 031	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	7,84	+	+	+	+	
AER 036	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 042	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	81,98	+	N/A	+	N/A	
AER 063	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 069	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	19,47	+	+	-	+	
AER 173	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	24,37	+	+	+	+	
AER 176	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	13,5	+	+	+	-	
AER 206	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	8,86	+	+	+	+	
AER 214	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 216	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 221	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 235	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	27,92	+	N/A	+	N/A	
AER 240	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	5,08	+	+	+	+	
AER 269	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	14,59	+	+	+	+	

Vedlegg 1: Oppsummering av analyseresultater for isolatene

<i>Isolat</i>	<i>Fra matvare</i>	<i>Referanse</i>	<i>Vekst</i>	<i>DNA (ng/μl)</i>	<i>radA amplikon</i>	<i>rpoD amplikon</i>	<i>radA-sekvens</i>	<i>rpoD-sekvens</i>	<i>Bemerkninger</i>
AER 280	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	30,46	+	+	+	+	
AER 284	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	48,59	+	+	+	+	
AER 288	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	24,08	+	+	+	+	
AER 299	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	17,76	+	N/A	+	N/A	
AER 304	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	70,4	+	+	+	+	
AER 309	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 315	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	13,32	+	+	+	+	
AER 319	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 320	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 322	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	78,54	+	+	+	+	
AER 331	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	19,85	+	+	N/A	+	Tom radA-brønn ved klargjøring for sekvensering
AER 358	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 634	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 643	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 648	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	8,86	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 655	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	14,35	+	N/A	+	N/A	
AER 660	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 667	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	15,88	+	+	-	+	
AER 671	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	51,5	+	N/A	+	N/A	

Vedlegg 1: Oppsummering av analyseresultater for isolatene

<i>Isolat</i>	<i>Fra matvare</i>	<i>Referanse</i>	<i>Vekst</i>	<i>DNA (ng/μl)</i>	<i>radA amplikon</i>	<i>rpoD amplikon</i>	<i>radA-sekvens</i>	<i>rpoD-sekvens</i>	<i>Bemerkninger</i>
AER 675	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	23,8	+	N/A	+	N/A	
AER 677	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 678	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 679	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	8,63	+	N/A	-	N/A	
AER 680	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	20,82	+	N/A	+	N/A	
AER 683	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	8,45	+	N/A	+	N/A	
AER 684	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	25,53	+	N/A	+	+	
AER 687	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	9,38	+	N/A	+	N/A	
AER 689	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	58,90	-	+	N/A	+	
AER 691	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	47,22	+	N/A	+	N/A	
AER 693	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	
AER 695	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	64,60	-	+	N/A	N/A	Høye absorbansverdier indikerte kontaminert DNA
AER 696	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	98,3	+	+	+	+	
AER 698	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	21,32	+	+	+	+	
AER 701	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	6,81	+	N/A	+	N/A	
AER 703	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	13,54	+	+	+	+	
AER 709	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	17,76	+	N/A	+	N/A	
AER 715	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	9,98	+	+	+	+	
AER 718	Salatprodukt	(Umutoni et al., 2020)	+	20,50	+	N/A	+	N/A	

Vedlegg 1: Oppsummering av analyseresultater for isolatene

<i>Isolat</i>	<i>Fra matvare</i>	<i>Referanse</i>	<i>Vekst</i>	<i>DNA (ng/μl)</i>	<i>radA amplikon</i>	<i>rpoD amplikon</i>	<i>radA-sekvens</i>	<i>rpoD-sekvens</i>	<i>Bemerkninger</i>
<i>HJL-S1</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	29,17	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S2</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	52,25	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S3</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	21,11	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S4</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	30,47	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S5</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	33,34	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S6</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	32,39	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S7</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	31,48	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S8</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	27,67	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S9</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	38,55	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S10</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	27,17	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S11</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	25,39	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S12</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	22,55	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S13</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	46,89	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S14</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	16,72	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S15</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	33,51	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S16</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	39,97	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S17</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	26,05	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-S18</i>	Sushi	(Lee et al., 2020)	+	28,21	+	N/A	+	N/A	
<i>HJL-O1</i>	Østers	(Lee et al., 2020)	+	23,96	+	N/A	+	N/A	

Vedlegg 1: Oppsummering av analyseresultater for isolatene

<i>Isolat</i>	<i>Fra matvare</i>	<i>Referanse</i>	<i>Vekst</i>	<i>DNA (ng/μl)</i>	<i>radA amplikon</i>	<i>rpoD amplikon</i>	<i>radA-sekvens</i>	<i>rpoD-sekvens</i>	<i>Bemerkninger</i>
HJL-O2	Østers	(Lee et al., 2020)	+	18,81	+	N/A	+	N/A	
HJL-O3	Østers	(Lee et al., 2020)	+	19,10	+	N/A	+	N/A	
HJL-O4	Østers	(Lee et al., 2020)	+	19,47	+	N/A	+	N/A	
HJL-O5	Østers	(Lee et al., 2020)	+	19,80	+	N/A	+	N/A	
HJL-O6	Østers	(Lee et al., 2020)	+	25,08	+	N/A	+	N/A	
HJL-O7	Østers	(Lee et al., 2020)	+	24,37	+	N/A	+	N/A	
HJL-O8	Østers	(Lee et al., 2020)	+	22,55	+	N/A	+	N/A	
HJL-O52	Østers	(Lee et al., 2020)	+	20,84	+	N/A	+	N/A	
HJL-O53	Østers	(Lee et al., 2020)	+	22,99	+	N/A	+	N/A	
HJL-O54	Østers	(Lee et al., 2020)	+	12,68	+	N/A	+	N/A	
HJL-SC42	Kamskjell	(Lee et al., 2020)	+	22,34	+	N/A	+	N/A	
HJL-SC43	Kamskjell	(Lee et al., 2020)	+	26,65	+	N/A	+	N/A	
HJL-SC44	Kamskjell	(Lee et al., 2020)	+	32,30	+	N/A	+	N/A	
SU16-2	Sushi	(Hoel et al., 2017)	+	16,72	+	N/A	+	N/A	
SU37-2	Sushi	(Hoel et al., 2017)	+	43,22	+	N/A	+	N/A	
SU38-1	Sushi	(Hoel et al., 2017)	+	22,55	+	N/A	+	N/A	
BIO-054	Sushi	(Hoel et al., 2017)	+	27,17	+	N/A	+	N/A	
A539	Sushi	(Hoel et al., 2017)	+	12,61	+	N/A	+	N/A	

+ angir positivt resultat, - angir negativt resultat, N/A angir at analyse ikke er gjennomført.

Vedlegg 2: Detaljert BLAST-data for nukleotidsekvensene

	<i>radA</i>					<i>gyrB</i>					<i>rpoD</i>				
	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID %	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID%	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID%
AER001	483	A.rivipollensis	872/872	0,0	99,18	1080	A.media	1777/1777	0,0	96,67	730	A.hydrophila	1312/1312	0,0	99,18
AER013	483	A.media	867/867	0,0	98,97	724	A.media	1273/1273	0,0	100					
AER031	491	A.rivipollensis	863/863	0,0	98,57	1096	A.media	1666/1666	0,0	94,85	742	A.sp 239	1312/1312	0,0	98,78
AER042	489	A.rivipollensis	804/804	0,0	96,51	1059	A.media	1879/1879	0,0	98,68					
AER069						725	A.media	1242/1242	0,0	97,91	743	A.media	1336/1336	0,0	99,32
AER173	470	A.rivipollensis	841/841	0,0	98,94	1082	A.hydrophila	1779/1779	0,0	96,68	733	A.media	1317/1317	0,0	99,31
AER176	483	A.media	867/867	0,0	98,97	622	A.media	1122/1222	0,0	99,20					
AER206	482	A.rivipollensis	791/791	0,0	96,27	1067	A.sp JH64	1877/1877	0,0	98,50	740	A.media	1339/1339	0,0	99,46
AER235	491	A.media	876/876	0,0	99,18	1071	A.media	1842/182	0,0	97,85					
AER240	490	A.rivipollensis	856/856	0,0	98,56	1064	A.media	1873/1873	0,0	98,50	736	A.media	1315/1315	0,0	99,05
AER269	491	A.media	870/870	0,0	98,97	1074	A.media	1808/1808	0,0	97,64	740	A.rivipollensis	1334/1334	0,0	99,32
AER280	490	A.rivipollensis	859/914	0,0	98,56	710	A.media	1254/1254	0,0	98,59	730	A.encheleia	1334/1334	0,0	99,73
AER284	482	A.rivipollensis	876/876	0,0	99,38	1085	A.media	1744/1744	0,0	96,04	736	A.sp KC8	1308/1308	0,0	99,04
AER288	489	A.rivipollensis	869//923	0,0	98,57	1080	A.media	1794/1794	0,0	96,95	735	A.rivipollensis	1319/1319	0,0	99,18
AER299	482	A.rivipollensis	846/901	0,0	98,34	771	A.media	1387/1387	0,0	99,35					
AER304	491	A.rivipollensis	867/921	0,0	98,77	1084	A.sp JH64	1781/1781	0,0	96,68	731	A.media	1290/1290	0,0	98,63
AER315	469	A.rivipollensis	841/841	0,0	99,14	1083	A.media	1788/1788	0,0	97,19	740	A.sp P1D3	1317/1317	0,0	98,92
AER322	480	A.rivipollensis	850/850	0,0	98,55	1059	A.media	1899/1899	0,0	99,06	735	A.media	1308/1308	0,0	98,91
AER331											738	A.sp 57	1343/1343	0,0	99,59
AER655	271	A.rivipollensis	496/496	5,00	99,63	1085	A.media	1788/1788	0,0	97,71					
AER667				E- 136							739	A.rivipollensis	1339/1339	0,0	99,46
AER671	470	A.media	841/841	0,0	98,94	1046	A.sp JH64	1827/1827	0,0	98,02					
AER675	485	A.rivipollensis	863/863	0,0	98,77	1065	A.sp 2P2A9	1912/1912	0,0	99,62					

Vedlegg 2: Detaljert BLAST-data for nukleotidsekvensene

	<i>radA</i>					<i>gyrB</i>					<i>rpoD</i>				
	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID %	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID%	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID%
<i>AER680</i>	491	A.media	870/870	0,0	98,97	1069	A.sp JH64	1862/1862	0,0	98,22					
<i>AER683</i>	469	A.rivipollensis	852/852	0,0	99,57	1080	A.media	1812/1812	0,0	98,18					
<i>AER684</i>	409	A.rivipollensis	686/686	0,0	97,98	1067	A.media	1866/1866	0,0	99,32	733	A.rivipollensis	1330/1330	0,0	99,45
<i>AER689</i>											727	Pseudomonas fluorescens	1286/1286	0,0	98,89
<i>AER687</i>	490	A.media	870/870	0,0	98,97	1060	A.media	1903/1903	0,0	99,06					
<i>AER691</i>	480	A.rivipollensis	845/899	0,0	98,34	1071	A.media	1805/1805	0,0	97,99					
<i>AER696</i>	483	A.media	859/859	0,0	98,76	1085	A.media	1777/1777	0,0	96,59	740	A.sp P1D3	1303/1303	0,0	98,64
<i>AER698</i>	483	A.rivipollensis	872/872	0,0	99,18	1126	A.media	1585/1585	0,0	94,27	740	A.rivipollensis	1345/1345	0,0	99,73
<i>AER701</i>	484	A.rivipollensis	874/874	0,0	99,18	1106	A.media	1685/1685	0,0	95,62					
<i>AER703</i>	490	A.rivipollensis	881/881	0,0	99,38	1069	A.media	1879/1879	0,0	98,50	730	A.sp 480	1291/1291	0,0	98,76
<i>AER709</i>	469	A.rivipollensis	841/841	0,0	99,14	700	A.media	1243/1243	0,0	98,72					
<i>AER715</i>	479	A.rivipollensis	865/865	0,0	99,17	1077	A.media	1840/1840	0,0	97,86	734	A.hydrophila	1308/1308	0,0	98,91
<i>AER718</i>	482	A.salmonicida	852/852	0,0	98,55	759	A.salmonicida	1376/1376	0,0	99,60					
<i>CCUG1455</i>	491	A.hydrophila ATCC 1	902/902	0,0	100	1075	A.hydrophila ATCC 7966	1892/1892	0,0	100					
<i>HJL-S1</i>	467	A.rivipollensis	836/837	0,0	99,14	1070	A.media	1875/1875	0,0	98,50					
<i>HJL-S2</i>	491	A.rivipollensis	867/867	0,0	98,97	1074	A.media	1884/1884	0,0	98,50					
<i>HJL-S3</i>	483	A.rivipollensis	865/865	0,0	98,97	1066	A.media	1875/1875	0,0	98,59					
<i>HJL-S4</i>	486	A.rivipollensis	859/859	0,0	98,76	1071	A.media	1892/1892	0,0	98,60					
<i>HJL-S5</i>	491	A.rivipollensis	867/867	0,0	98,77	1069	A.media	1882/1882	0,0	98,59					
<i>HJL-S6</i>	483	A.rivipollensis	861/861	0,0	98,76	1002	A.media	1779/1779	0,0	98,80					
<i>HJL-S7</i>	491	A.rivipollensis	870/870	0,0	98,97	1073	A.media	1884/1884	0,0	98,50					
<i>HJL-S8</i>	490	A.rivipollensis	876/876	0,0	99,18	1076	A.media	1892/1892	0,0	98,69					
<i>HJL-S9</i>	485	A.rivipollensis	863/863	0,0	98,77	1071	A.media	1884/1884	0,0	98,50					

Vedlegg 2: Detaljert BLAST-data for nukleotidsekvensene

	<i>radA</i>					<i>gyrB</i>					<i>rpoD</i>				
	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID %	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID%	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID%
<i>HJL-S10</i>	480	A.rivipollensis	856/856	0,0	98,76	1070	A.sp 2P2A9	1829/1829	0,0	98,10					
<i>HJL-S11</i>	491	A.rivipollensis	872/872	0,0	99,18	1070	A.media	1892/1892	0,0	98,87					
<i>HJL-S12</i>	481	A.rivipollensis	850/850	0,0	98,55	1074	A.media	1893/1893	0,0	98,69					
<i>HJL-S13</i>	490	A.rivipollensis	870/870	0,0	98,97	1070	A.media	1877/1877	0,0	98,50					
<i>HJL-S14</i>	485	A.rivipollensis	869/869	0,0	98,97	1071	A.media	1901/1901	0,0	98,87					
<i>HJL-S15</i>	483	A.rivipollensis	863/863	0,0	98,96	1063	A.media	1871/1871	0,0	98,49					
<i>HJL-S16</i>	468	A.rivipollensis	846/846	0,0	99,36	1068	A.media	1881/1881	0,0	98,59					
<i>HJL-S17</i>	469	A.rivipollensis	846/846	0,0	99,36	1072	A.media	1895/1895	0,0	98,69					
<i>HJL-S18</i>	489	A.rivipollensis	876/876	0,0	99,18	1068	A.media	1882/1882	0,0	99,05					
<i>HJL-SC42</i>	470	A.rivipollensis	857/857	0,0	99,79	1074	A.media	1897/1897	0,0	98,69					
<i>HJL-SC43</i>	485	A.rivipollensis	872/872	0,0	99,18	1067	A.media	1886/1886	0,0	98,69					
<i>HJL-SC44</i>	491	A.rivipollensis	883/883	0,0	99,59	1073	A.media	1895/1895	0,0	98,60					
<i>HJL-O1</i>	481	A.rivipollensis	863/863	0,0	98,96	1067	A.media	1860/1860	0,0	98,22					
<i>HJL-O2</i>	481	A.rivipollensis	863/863	0,0	98,96	1065	A.media	1851/1851	0,0	98,12					
<i>HJL-O3</i>	490	A.rivipollensis	867/867	0,0	98,77	1071	A.media	1862/1862	0,0	98,22					
<i>HJL-O4</i>	486	A.rivipollensis	863/863	0,0	98,77	1071	A.media	1852/1852	0,0	98,21					
<i>HJL-O5</i>	483	A.rivipollensis	865/865	0,0	98,97	1074	A.media	1862/1862	0,0	98,22					
<i>HJL-O6</i>	481	A.rivipollensis	856/856	0,0	98,76	1068	A.media	1853/1853	0,0	98,30					
<i>HJL-O7</i>	481	A.rivipollensis	854/854	0,0	98,76	1068	A.media	1847/1847	0,0	98,20					
<i>HJL-O8</i>	484	A.rivipollensis	867/867	0,0	98,97	1069	A.media	1855/1855	0,0	98,21					
<i>HJL-O52</i>	483	A.media	861/861	0,0	98,76	1069	A.sp JH64	1908/1908	0,0	99,06					
<i>HJL-O53</i>	489	A.media	867/867	0,0	98,97	1073	A.sp JH64	1917/1917	0,0	99,25					
<i>HJL-O54</i>	481	A.media	856/856	0,0	98,76	1072	A.sp JH64	1917/1917	0,0	99,16					
<i>SU16-2</i>	490	A.rivipollensis	859/859	0,0	98,56	1028	A.media*	1899/1899	0,0	100					
<i>SU37-2</i>	488	A.rivipollensis	854/854	0,0	98,36	1031	A.media*	1905/1905	0,0	100					

Vedlegg 2: Detaljert BLAST-data for nukleotidsekvensene

	<i>radA</i>					<i>gyrB</i>					<i>rpoD</i>				
	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID %	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID%	Sekvens- lengde	Navn	Maks- / Totalscore	E- verdi	ID%
<i>SU38-1</i>	469	A. media	841/841	0,0	99,14	978	A.media*	1803/1803	0,0	100					
<i>BIO-054</i>	483	A.rivipollensis	843/903	0,0	98,35	1028	A.media*	1892/1892	0,0	100					
<i>A539</i>	480	A.rivipollensis	856/856	0,0	98,76	1030	A.media*	1899/1899	0,0	100					

* Sekvensene er i tidligere publikasjoner ført inn i GenBank : KY652255.1, KY652257.1, KY652253.1, KY652254.1 KY652256.1