

Lea May

Identifikasjon og karakterisering av *Photobacterium* stammer isolert fra rødspette (*Pleuronectes platessa*)

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft

Veileder: Anita Nordeng Jakobsen

Medveileder: Dionysios Tsoukalas

Juni 2022

Lea May

Identifikasjon og karakterisering av *Photobacterium* stammer isolert fra rødspette (*Pleuronectes platessa*)

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft
Veileder: Anita Nordeng Jakobsen
Medveileder: Dionysios Tsoukalas
Juni 2022

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet
Fakultet for naturvitenskap
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Kunnskap for en bedre verden

Sammendrag

Photobacterium spp. er påvist som dominerende forringelsesbakterie i rødspette uavhengig av sesong og pakkebetingelser. For å tilrettelegge produktutvikling av lett prosesserte, enkle og forbrukervennlige produkter av rødspette er det derfor nødvendig å kartlegge artsmangfoldet og betydningen av *Photobacterium* spp. i tillegg til å øke kunnskapen om hemmende barrierer. Hovedmålet med denne masteroppgaven var å analysere diversiteten i *Photobacterium* slekten i lettprosesserte rødspette produkter og undersøke dens toleranse for aktuelle prosesseringsfaktorer. I tillegg var hensikten å kartlegge mulig variasjon i toleranse for ulike miljøfaktorer basert på artsnivå, fangstsesong og isolasjonsatmosfære.

I denne studien ble sekvensanalyse utført av tre husholdningsgener (*gyrB*, *gapA* og *recA*) og 16S rRNA til 54 *Photobacterium* stammer isolert fra rødspette under ulike lagringsbetingelser (MAP, vakuum og luft) og sesonger (april og september). Screeningsforsøk av stammenes vekst og generering av bioluminescens ble utført for å analysere vekst ved ulike temperaturer (4, 8, 15 og 20 °C), høy CO₂ konsentrasjon (100 %) og ulike saltkonsentrasjoner (0, 1, 3 og 6 % NaCl). For å undersøke artsbasert variasjon i vekst ble vekstkinetikk parametere analysert for seks utvalgte *Photobacterium* stammer ved ulike temperaturer (4, 8, 12 og 16 °C) og ulike saltkonsentrasjoner (0, 1, 3 og 6 % NaCl).

Ved sekvensering av husholdningsgenene ble de 54 stammene identifisert som *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* og *P. piscicola*. 16S rRNA sekvenseringsanalyse resulterte i ulik klassifisering av 63 % av stammene. Vekstkinetikk parametere indikerte lite artsbasert variasjon i vekst mellom *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* og *P. piscicola*, og at stammene var i stand til å vokse ved kjøletemperatur (4 °C) i kombinasjon med 0, 1 og 3 % NaCl. Fullstendig hemmet vekst ble observert for de fleste stammene ved 6 % NaCl kombinert med 4 °C, og hos noen stammer også ved 15 °C. Ved aktuelle prosesseringsfaktorer for lett prosessert rødspette som kjøletemperatur (4 °C) i kombinasjon med 0 og 1 % NaCl hadde CO₂ en mer hemmende effekt på de fleste stammene sammenlignet med luft. Videre viste vekstkinetikk parametere at 4 °C i kombinasjon med 1 % NaCl ga ca. 2/3 lavere veksthastighet sammenlignet med 8 °C. Et økt vekstpotensial ble observert hos stammer isolert i april sammenlignet med stammer isolert i september ved inkubering med ulike temperaturer, men ikke ulike saltkonsentrasjoner. Videre ble relativt lite variasjon i gjennomsnittlig vekst observert basert på stammenes ulike isolasjonsatmosfærer.

Abstract

Photobacterium spp. was detected as the predominant deterioration bacterium in plaices regardless of season and packing conditions. To assist product development of easily processed and consumer-friendly plaice products, it is necessary to map diversity and significance of the *Photobacterium* spp., and gain knowledge about inhibitory barriers. The main goal of this master's thesis was therefore to analyze the diversity of the *Photobacterium* family in easily processed plaice products and to examine its tolerance towards popular process factors. A further intention was to investigate possible variations of tolerance towards various environmental factors considering type of species, fishing season and isolation atmosphere.

In this study, sequence analyses were carried out by three protein coding genes (*gyrB*, *gapA* and *recA*) and 16S rRNA for 54 *Photobacterium* strains, which are isolated from plaice under different storage conditions (MAP, vacuum, air) and seasons (April and September). Screening experiments of the growth of the strains and generation of bioluminescence were accomplished to analyze growth at different temperatures (4, 8, 15 and 20 °C), different salt concentrations (0, 1, 3 and 6 % NaCl) and high CO₂ concentrations (100 %). Furthermore, growth kinetic parameters were obtained for six selected *Photobacterium* strains at different temperatures (4, 8, 12 and 16 °C) and different salt concentrations (0, 1, 3 and 6 % NaCl).

By sequencing the protein coding genes, the 54 strains were identified as *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* and *P. piscicola*. 16S rRNA sequencing analyses resulted in different classifications of 63 % of the strains. Growth kinetic parameters indicated little species-based variation in growth between *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* and *P. piscicola* and that the strains were able to grow at a chilling temperature of 4 °C in combination with 0, 1 and 3 % NaCl. Completely inhibited growth was discovered for most strains at 6 % NaCl and 4 °C and in some strains at 15 °C. At common process factors for easily processed plaice, such as cooling temperature of 4 °C in combination with 0 and 1 % NaCl, CO₂ concentration had a more inhibitory effect on most strains compared to air. Furthermore, growth kinetic parameters showed that 4 °C in combination with 1 % NaCl gave approximately 2/3 lower growth rate compared to 8 °C. Increased growth potential was observed in April-isolated strains rather than in September-isolated ones by incubation at different temperatures, but not at different salt concentrations. However, relatively similar growth was found between strains isolated from different isolation atmospheres.

Innhold

SAMMENDRAG	I
ABSTRACT	II
FORORD	V
1 INTRODUKSJON	1
2 TEORETISK BAKGRUNN	4
2.1 LITE UTNYTTETE RESSURSER	4
2.1.1 Rødspette som lite utnyttet ressurs	5
2.2 FORRINGELSE I FISK	6
2.2.1 Mikrobiell forringelse	8
2.3 <i>PHOTOBACTERIUM</i> SPP	10
2.3.1 <i>Photobacterium</i> spp. som forringelsesorganisme	13
2.3.2 Identifisering av <i>Photobacterium</i> spp.	14
2.4 LETTPROESSERING AV SJØMAT	15
2.5 BARRIERETEKNOLOGI	16
2.5.1 Kjøling	16
2.5.2 MAP	17
2.5.3 Salt	17
3 MATERIAL OG METODE	19
3.1 BAKTERIE STAMMENE	20
3.2 SCREENINGSFORSØK AV <i>PHOTOBACTERIUM</i> ARTER VED ULIKE MILJØFAKTORER	21
3.3 IDENTIFISERING AV STAMMER VED PCR AMPLIFISERING OG SEKVENSERING AV <i>GYRB</i> , <i>GAP A</i> OG <i>RECA</i>	23
3.3.1 DNA ekstrahering	23
3.3.2 PCR amplifisering	23
3.3.3 Gel elektroforese	24
3.3.4 Sekvensering	25
3.4 VEKSTKINETIKK FORSØK	26
3.5 DATABEHANDLING OG STATISTISKE ANALYSER	27
4 RESULTATER	28
4.1 ARTSDIVERSITET HOS <i>PHOTOBACTERIUM</i> STAMMENE	28
4.1.1 Identifisering av stammer basert på 16S rRNA, <i>gyrB</i> , <i>gapA</i> og <i>recA</i> sekvenser	28
4.1.2 Fylogenetisk analyse	30
4.2 VEKST AV <i>PHOTOBACTERIUM</i> ARTER VED ULIKE MILJØFAKTORER	34
4.2.1 Temperatur	35
4.2.2 Salttoleranse	37
4.2.3 CO ₂ toleranse	38
4.2.4 Bioluminescens	39
4.3 VEKSTKINETIKK PARAMETERE FOR SEKS <i>PHOTOBACTERIUM</i> STAMMER	40
4.3.1 Temperaturavhengige vekstkinetikk parametere	40
4.3.2 Saltkonsentrasjonsavhengige vekstkinetikk parametere	47
5 DISKUSJON	50
5.1 GENOTYPISK IDENTIFISERING AV <i>PHOTOBACTERIUM</i> STAMMER	50
5.2 FENOTYPISK KARAKTERISERING AV <i>PHOTOBACTERIUM</i> STAMMER	53
5.2.1 Effekt av temperatur på <i>Photobacterium</i> stammer	53
5.2.2 Effekt av NaCl på vekst av <i>Photobacterium</i> stammer	55
5.2.3 Effekt av CO ₂ på vekst av <i>Photobacterium</i> stammer	58
5.3 EFFEKT AV FANGSTSESONG OG ISOLASJONSATMOSFÆRE PÅ VEKST AV <i>PHOTOBACTERIUM</i> STAMMER	59
5.4 EVNEN TIL Å GENERERE BIOLUMINESCENS HOS <i>PHOTOBACTERIUM</i> STAMMER	60
6 KONKLUSJON	62

7 FORSLAG TIL VIDERE ARBEID.....	63
REFERANSELISTE.....	64
VEDLEGG A LONG AND HAMMER AGAR.....	74
VEDLEGG B OVERSIKT OVER REFERANSE STAMMENE	75
VEDLEGG C EKSEMPEL PÅ AGAROSE GEL	77
VEDLEGG D RESULTATER FRA SCREENINGSFORSØK VED ULIKE TEMPERATURER	78
VEDLEGG E RESULTATER FRA SCREENINGSFORSØK VED ULIKE SALTKONSENTRASJONER	79

Forord

Denne masteroppgaven fullfører kravene for graden Master of science i matvitenskap, teknologi og bærekraft ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Arbeidet i denne oppgaven er utført under veiledning av Anita Nordeng Jakobsen, Ph.D. og Ph.D. kandidat Dionysios Tsoukalas ved Institutt for bioteknologi og matvitenskap.

Jeg vil også gjerne benytte denne anledningen til å takke min hovedveileder Anita Nordeng Jakobsen for god veiledning underveis i arbeidet og med rapportskrivningen. Videre vil jeg også takke min biveileder Dionysios Tsoukalas for deling av kunnskap på fagområdet. Hans bidrag ved de tidskrevende laboratorieforskene har vært helt nødvendige. Jeg er veldig takknemlig for deres råd under arbeidet og verdifulle kommentarer til denne oppgaven.

Til slutt vil jeg takke mine medstudenter, familie og venner for støtte underveis i studieløpet. Denne tiden hadde ikke vært denne samme uten dere.

Lea May

Trondheim, 06. juni 2022

1 Introduksjon

Havbruk er en av Norges viktigste fremtidsnæringer og vil kunne bidra til å sikre tilstrekkelig tilgang til næringsrik og bærekraftig sjømat til den voksende befolkningen (Norges Sjømatråd, 2022). I Nordsjøen er rødspette (*Pleuronectes platessa*) en av de mest utbredte flatfiskartene (Madsen et al., 2013) og står for en stor andel av flatfisk fangsten i flere europeiske land (EC, 2020). I sammenheng med forflytning av fisk nordover, forventes en økning av rødspette bestanddeler i nordligere farvann. Denne arten kan derfor få en økt betydning for norsk fisk fangst framover (EC, 2020). Per i dag er rødspette av lite kommersiell interesse i Norge og fiskes ofte som bifangst (Havforskningsinstituttet, 2020). I 2021 var rødspette fangsten på 848 tonn (hel fisk ekvivalent) (IMR, 2020), til tross for en total kvote i Nordsjøen og Skagerrak på 162 607 tonn (International Council for the Exploration of the Sea, 2020). Dette indikerer et stort potensiale for framtidig utnyttelse av rødspette, både for kommersielt forbruk innenlands og eksport (Oddrun & Edgar, 2011).

Høsting av nye eller lite utnyttede marine arter inkludert rødspette, vil kunne bidra til et mer bærekraftig uttak av marine ressurser og til å sikre verdiskapningen i fiskesektoren (Misund et al., 2020). I sammenheng med dette er denne oppgaven tilknyttet det strategiske forskningsprosjektet «Optimal utnyttelse av havets matressurser» (OPTiMAT). Et av forskningsområdene i prosjektet omhandler lite utnyttede marine ressurser (LUR). Hovedmålet er å øke kunnskapen om kvaliteten og videreforedling av disse artene til konsumervennlige produkter. Denne kunnskapen kan på sikt bidra til økt verdiskapning i fiskerisektoren. Endringer i forbrukernes holdning knyttet til klimaendringer og krav om bærekraftig forvaltning av marine ressurser påvirker også fiskenæringen. Kommersiell utnyttelse av nye arter og bedre utnyttelse av råstoff kan være løsningen for å redusere overbeskattede fiskebestander og sikre bærekraftig ressursuttak (Oddrun & Edgar, 2011).

Videre er det nødvendig med optimalisering av konserveringsmetoder som gir utvidet produkt holdbarhetstid (DNV, 2021). Mikrobiell forringelse står for 25 % av alt kastet mat. Det er derfor viktig å øke kunnskapen om konserveringsmetoder som hemmer forringelsesmikroorganismer og samtidig bevarer råstoffets ernæringsmessige og sensoriske kvalitet. Økt holdbarhetstid på produktene vil også bidra til å redusere matsvinn. (Robson et al., 2007)

De siste årene har et ønske om naturlige, sunne og lett prosesserte produkter økt blant forbrukerne. For sjømat- og fiskeprodukter er anvendelsen av skånsomme konserveringsmetoder som lett salting, modifisert atmosfære pakking (MAP), vakuumpakking og kjøling derfor svært aktuelt (Cortesi et al., 2009; Frank et al., 2004). Økt utnyttelse av rødspette krever dermed å tilby forbrukervennlige og etterspurte produkter av rødspette som kjølt, fersk eller lett prosesserte fileter, pakket i ulike emballasjematerialer (Adhikari et al., 2021; Mueller Loose et al., 2013). Bruken av mildere prosessbetingelser kan imidlertid ha en mindre hemmende effekt på mikrobiell aktivitet og medføre utfordringer knyttet til mikrobiell forringelse og kortere holdbarhetstid (Hao et al., 2021).

Photobacterium spp. er blant de viktigste forringelsesorganismene i kjølelagret hvitfisk og dokumentert som den dominerende forringelsesorganismen i MAP produkter (Lerfall et al., 2022; Sivertsvik, 2007). I et tidligere forsøk utført av Ph.D. kandidat Dionysios Tsoukalas ved NTNU, ble *Photobacterium* spp. påvist som dominerende forringelsesorganisme i kjølelagret rødspette lagret i tre ulike atmosfærer: Hel rødspette lagret på is (0 °C) i luft, under MAP (70 % CO₂, 20 % N₂, 10 % O₂) ved 4 °C og i vakuumpakking ved 4 °C, og fra to ulike fangstsesonger. Kjølelagring i kombinasjon med de valgte pakkebetingelsene var ikke tilstrekkelige barrierer for å inhibere *Photobacterium* spp. For å øke den mikrobielle holdbarheten til kjølelagret rødspette er det derfor nødvendig med mer kunnskap om barrierer mot *Photobacterium* spp.

Hovedmålet med denne masteroppgaven er å bidra til økt kunnskap om diversitet i *Photobacterium* slekten i lettprosesserte rødspette produkter. Dette for å oppnå økt holdbarhet og mattrygghet i rødspette produkter. Basert på dette ble det undersøkt effekten av ulike miljøfaktorer på vekst av *Photobacterium*, for å oppnå forlenget holdbarhet og økt mattrygghet i rødspette. I denne sammenhengen ble 54 *Photobacterium* isolater fra rødspette under ulike lagringsbetingelser (MAP, vakuumpakking og luft) og sesonger (april og september) brukt til:

- Identifisering på artsnivå for kartlegging av fylogenetiske sammenheng ved sekvenseringsanalyse av 16S rRNA i kombinasjon med ulike husholdningsgener.
- Fenotypisk karakterisering av *Photobacterium* artene for å kartlegge eventuelle forskjeller i vekstkinetikk parametere basert på artsnivå.

- Screening av vekst som funksjon av temperatur, salt og CO₂ blant *Photobacterium* isolatene fra rødspette for å identifisere eventuell variasjon vekst basert på ulike isolasjonskilder (atmosfæreforhold og sesong).

2 Teoretisk bakgrunn

2.1 Lite utnyttete ressurser

I dag utnyttes bare 10-15 % av de omtrent 220 tilgjengelige artene i norsk farvann kommersielt (Johnsen, 2000; Oddrun & Edgar, 2011). Resten av artene som ikke eller i liten grad utnyttes betegnes som lite utnyttede ressurser. Arbeidet med å kommersialisere LUR-arter har pågått helt siden slutten av 70-tallet. Til tross for en rekke forsøk av fiskeri på LUR-arter lyktes kun et fåtall arter, for eksempel taskekrabbe og stavsild. Kommersialiseringsprosessen har vist seg å være en lang og tidskrevende prosess med utfordringer langs hele verdikjeden. Lite lønnsomhet i deler av verdikjeden regnes som hovedårsak (Oddrun & Edgar, 2011).

Et tilstrekkelig ressursgrunnlag av den enkelte arten eller artsgruppen er viktig for å kunne gi et omfattende utbytte. I tillegg er det viktig med kunnskap om bestander, samt hva de tåler av beskatning for å kunne garantere vedvarende lønnsomhet. Noen arter som for eksempel kråkeboller, maneter og sel bidrar til negativ bestandsutvikling for andre viktige arter i fiskenæringen og krever dermed tilpasning av strategien for utnyttelse. Dessuten er ledig kapasitet i kystflåten og foredlingsledd avgjørende faktorer for utviklingen (Oddrun & Edgar, 2011).

Fisk- og skalldyr næringen i Norge er konsentrert rundt et fåtall arter som har høy markedsverdi og som kan høstes i store volum. Dette medbringer sårbarhet for kvotereduksjon av disse artene og gir motivasjon for utnyttelse av nye arter langs norske kysten. Samtidig gjør dagens ressursituasjon at kystflåten verken har behov eller kapasitet til å utnytte andre arter enn de kvotepålagte artene, noe som vises ved at store deler av kvotegrunnlaget forbli ufisket (hyse og sei). Ikke tilstrekkelige fangstrater på kort og lang sikt bidrar til at LUR-arter ikke har et stort nok økonomisk potensial til å kunne konkurrere om flåtekapasitet. (Henriksen, 2011)

2.1.1 Rødspette som lite utnyttet ressurs

I 10-15 år har forsknings- og utviklingsarbeid pågått for å etablere næringsaktivitet knyttet til LUR-arter med hensikt å finne ut hvilke arter som har de beste forutsetningene til å gi lønnsom utnyttelse. Dette innebærer faktorer som ressurspotensial, muligheter for fangst og produksjon, volum, pris, markedsmuligheter og langsiktig engasjerte aktører med en betydelig interesse for å utnytte arten (Oddrun & Edgar, 2011).

Et forslag til prioriterte LUR-arter for lønnsom utnyttelse er:

- Kongsnegl
- Drøbak-kråkeboller
- Flatfisk (lomre, piggvar, rødspette og smørflyndre)
- Maneter (flere arter)

Av disse LUR-artene fokuserer denne oppgaven videre på utnyttelse av flatfisker, med hovedfokus på rødspette (*Pleuronectes platessa*). Denne regnes som den viktigste arten knyttet til volum og verdi, mens piggvar, flyndrearter og lomre har en høy markedspris (Oddrun & Edgar, 2011).

Følgende punkter viser hvorfor FoU-arbeid bør rettes mot flatfisk for å oppnå økonomisk suksess ved kommersiell utnyttelse av LUR-arten (Oddrun & Edgar, 2011).

- Overveiende sannsynlig at ressursgrunnlaget er til stede for et vesentlig større uttak av flatfisk enn dagens.
- Det finnes marked innenlands så vel som eksport og artene distribueres i allerede kjente markedskanaler.
- Det finnes interessenter både på sjø og land som vil være interessert i å ta tak i utfordringene i ulike deler av verdikjeden.

Mellom 2003 og 2010 har det vært en reduksjon fra 4 tusen tonn til 2 tusen tonn landet flatfisk av kystflåten (Fiskedirektoratet, 2021). Prioritering av kysttorskvernet regnes som viktigste årsak til det ved å medføre vesentlig reduksjon i snurrevad fiske av flatfisk. Videre gir det fordelaktig kvoteutvikling for torsk, hyse og sei og dermed utfordringer ved satsing på flatfisker (Oddrun & Edgar, 2011).

Samtidig viser tabell 1 fordeler for satsing på flatfisk. En godt etablert verdikjede muliggjør for eksempel fokusering på å identifisere og fjerne flaskehalser. I tillegg er betalingsviljen for flatfisk kjent og at det er et etterspurt produkt på det europeiske markedet.

Tabell 1: Oversikt over fordeler ved fangst knyttet til ulike flatfisk arter (Oddrun & Edgar, 2011).

Piggvar	Den høyeste betalte flatfiskarten. Fanges i små mengder i garn og snurrevad.
Lomre	Tas som bifangst i snurrevad, trål og av og til garn. Den er en populær matfisk og oppnår en relativt høy pris i markedet.
Rødspette	Fiskes direkte i Nordsjøen. Langs kysten tas den som bifangst, og det er disse forekomstene som tas med i dette arbeidet. Pris til fisker er relativt lav (9-10 kr/kg), men forekomstene og fangstratene kan være relativt gode.
Smørflyndre, sandflyndre og tunge	Relativt små fangster tas som bifangst på garn og snurrevad. Tunge er svært godt betalt (opp mot 80 kr/kg til fisker), mens smørflyndre er middels godt betalt (15-20 kr/kg) og sandflyndre er dårlig betalt (under 10 kr/kg).

Flaskehalsen i verdikjeden oppstår eksempelvis ved at flatfisk som bifangst gir lite og uforutsebare kvalitet og volum, og dermed utfordringer i markeds- og distribusjonskanaler. Kontinuerlige leveringer og økte mengder ved mottak ville gitt bedre organiserte omsetningssystemer og verdikjeder. Ettersom flatfisk tåler svært godt levende lagring, gir dette mulighet for oppsamling og levende levering til sluttkunde. Dette gir både høye priser ved sluttkunden og kan være med på å løse problemer knyttet til kvalitet, kontinuitet og logistikk. (Oddrun & Edgar, 2011)

2.2 Forringelse i fisk

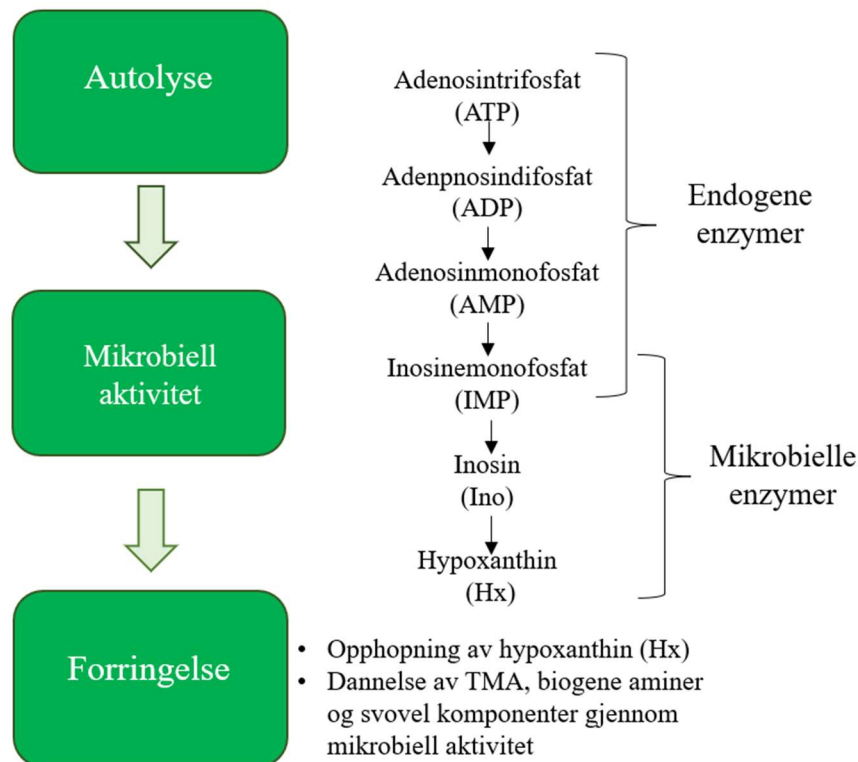
Fisk og sjømat er en rik kilde til essensielle næringsstoffer og bidrar til helsegevinster (Mohanty et al., 2019). I lett prosessert eller i fersk tilstand regnes fisk og sjømat som et lettbederverlig produkt med kort holdbarhetstid. Matforringelse er enhver endring i matvarens kvalitet som gjør den uønsket og dårlig egnet for konsum. Dette som følge av kvalitetsforringende faktorer som indikeres ved endring i utseende, lukt og tekstur. (Odeyemi et al., 2020) I fisk starter kvalitetsreducerende prosesser rett etter fangst og resulterer i dannelsen av komponenter som gir smaks-, lukt-, farge-, og teksturendringer (Gram & Huss, 2000; Mohanty et al., 2019). For å utsette de kvalitetsreducerende prosessene, bevare god kvalitet og oppnå lengst mulig holdbarhetstid er kjøletemperatur i tillegg til god håndtering og hygiene under bearbeiding og distribusjon viktige faktorer (Ghaly et al., 2010; Gökoğlu & Yerlikaya, 2015).

Ved optimale lagringsbetingelser er holdbarhetstiden for fersk fisk 1 til 2 uker og 3 til 4 uker for lett prosessert fisk (Gram, 2009). Mikrobiell aktivitet er vanligvis av størst betydning og den begrensende faktoren for holdbarhetstiden. 6,0 log kde/g ved aerob plattetelling regnes her som maksimalt antall bakterier for sensorisk forbrukeraksept (Fernández et al., 2009). I kvalitetsforringet fisk er normalt antall bakterier vanligvis mellom 7-8 log kde/g (Gram & Huss, 1996). Hel fisk er, i motsetning til filetert fisk, steril og har derfor vanligvis en lengre holdbarhetstid. Filetert fisk kan ha høyere antall mikroorganismer ettersom fiskens kontaminasjonsoverflate øker under fileteringsprosessen. Dette gir økt sannsynlighet for at mikroorganismer tilføres fileten gjennom kontakt med produksjonsutstyr som kniver og overflater. (Boziaris & Parlapani, 2017)

Fiskens evne å tilpasse seg temperaturer over en bred temperatur spekter muliggjør vekst av bakterier som trives både ved høye og lave temperaturer (Dalgaard, 1995; Huss, 1995). Risikoen for at forringelsesprosesser inntreffer under kjøling er derfor større, sammenlignet med andre typer kjøtt (Hao et al., 2021). Videre gir veldig lave mengder karbohydrater (< 0,5 %) i fiskenes muskelvev lite produksjon av melkesyre og resulterer i en høy post mortem pH (6,4-6,8). Dette bidrar til gunstige forhold for mikrobiell vekst.

I fetere fiskearter kan nedbrytning av langkjedete fettsyrer som eikosatetraensyre (EPA) og dokosaheksaensyre (DHA) bidrar til uønsket lukt og smak, samt uakseptable teksturendringer (Gram, 2009; Yu et al., 2020). I den primære og sekundære oksidasjonsfasen spaltes peroksidase til frie radikaler, som videre reagerer til alkaner, alkener, aldehyder og ketoner som resulterer i harsk lukt, herding av fiskevev og tekstur endring. (Pereira de Abreu et al., 2010)

Videre kan autolytisk nedbrytning av endogene enzymer bidrar til kvalitetsforringelse i fisk. Denne prosessen setter i gang umiddelbart etter fisken avlives og innebærer at adenosintrifosfat (ATP) brytes ned til en rekke forbindelser hvor inosin (Ino) og hypoksantin (Hx) dannes som sluttprodukter. Disse er presentert i figur 1. Disse komponentene bidrar til at fiskens smak og farge endres fra å være fisk til å bli mer nøytral og deretter til bitter, slik at produktet blir uakseptabelt for konsum (Yu et al., 2020). Degraderingsprosessen av Ino til Hx forårsakes ved siden av endogene enzymer hovedsakelig av mikrobielle enzymer. Forbindelsene brukes som substrat av bakterier og bidrar dermed til å indusere og fremme mikrobielle forringelse (Ghaly et al., 2010; Šimat & Mekinić, 2019).



Figur 1: Nedbrytningsforløpet av fisk etter fangst. Figuren er basert på (Šimat & Mekinić, 2019).

2.2.1 Mikrobiell forringelse

Mikrobiell forringelse er vanligvis hovedårsaken for kvalitetsforringelse i fisk. Dette basert på fiskens iboende egenskaper inkludert et høyt innhold av ikke-protein nitrogen-forbindelser og en høy post-mortem pH (ofte > 6,0). Videre har fisk en høy vannaktivitet og et høyt innhold av autolytiske enzymer som gir et optimalt miljø for mikrobiell vekst. (Gram & Dalgaard, 2002; Odeyemi et al., 2020) I starten av holdbarhetstiden består mikrobiotaen på fisk av endogene og eksogene mikroorganismer. Endogene mikroorganismer befinner seg naturlig på huden, gjellene og fordøyelsesorganer på levende fisk og kan spre seg ved slakting. Den eksogene mikrobiotaen inkluderer derimot mikroorganismer som finnes i miljø, kontaktoverflater og produksjonsarbeidere, og kan eksempelvis tilføres under fising, transport og prosessering (Hao et al., 2021). Fiskens opprinnelse, produkt håndtering, prosessforhold, distribusjon, lagringstemperatur og konserveringsmetoder/atmosfære, samt potensielle mikrobielle interaksjoner påvirker sammensetningen av den endogene og eksogene mikrobiotaen (Comi, 2017; Gram & Huss, 1996). Av denne er det kun de mest motstandsdyktige mikroorganismene som overlever lagrings- og prosessbetingelser som anvendes på produkter (Gram & Dalgaard,

2002). Videre har kun en liten andel av disse kvalitetsforringende egenskaper og defineres som spesifikke forringelsesorganismer (SSO) (Gram & Dalgaard, 2002).

Den iboende mikrobiotaen på fisk består vanligvis av et lavt antall mikroorganismer på 3-4 kde/g og varierer i henholdt til fiskens geografisk opprinnelse, demonstrert i tabell 2 (Boziaris & Parlapani, 2017). De vanligste gram-negative SSO i fisk og sjømat er *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Aeromonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*. Vanlige gram-positive bakterier inkluderer melkesyrebakterier (LAB), *Micrococcus*, *Corynebacterium*, *Vagococcus*, *Bacillus* og *Clostridium* (Gram & Huss, 1996; Parlapani et al., 2015; Svanevik & Lunestad, 2011). Andre bakterier som kan være i den iboende mikrofloraen eller som kan tilføres fisk ved postkontaminering under produksjonsprosessen er *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Vibrio* sp. og *Salmonella* sp. (Huss et al., 2000; Lacroix, 2010; Leroi, 2014; Lovdal, 2015).

Tabell 2: Oversikt over iboende mikrobiota på fisk som har ulik geografisk opprinnelse.

Kaldt vann (Nord-Atlanterhavet og Nordsjøen)	Temperert vann (Middelhavet)	Tropiske strøk
Gram-negative bakterier; <i>Photobacterium</i> , <i>Shewanella</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	Gram-positive bakterier; <i>Shewanella</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>	Økt antall gram-positive bakterier; <i>Shewanella</i> , <i>Psychrobacter</i> , <i>Pseudomonas</i>

Ikke-nitrogen protein fraksjonen i fisk inneholder vannløselige nitrogenmolekyler med lav molekylvekt, som eksempelvis frie aminosyrer og peptider. Disse brukes som metabolitter av bakterier og konverteres til nedbrytningsprodukter som Ino, Hx, hydrogensulfitt (H₂S), ammoniakk, biogene aminer og flyktige organiske forbindelser (Hao et al., 2021). Videre inneholder magre fiskearter trimetylaminoksid (TMAO), som har et høyt reduksjonspotensial. Flere bakterier som *Aeromonas* spp., psychrotolerante *Enterobacteriaceae*, *P. phosphoreum*, *Shewanella putrefaciens* og *Vibrio* spp. har evnen til å bruke denne forbindelsen som siste elektronakseptor ved anaerob respirasjon. Dette resulterer i nedbrytningsproduktet TMA som forårsaker dårlig smak og lukt (Gram & Huss, 1996; Ufnal et al., 2015).

På MAP eller vakuumpakket fisk fra kaldere strøk dominerer vanligvis *Photobacterium* spp. i magre fiskearter (Lerfall et al., 2022; Rudi et al., 2004) og melkesyrebakterier inkludert *Carnobacterium* og *Brochothrix thermosphacta* på fetere fiskearter (Dalgaard, 2005; Macé et

al., 2012; Macé et al., 2013). Tabell 3 presenterer de viktigste forringelsesbakterier i fisk avhengig av fet eller mager fiskeart og lagret ved ulike lagringsbetingelser.

Tabell 3: De viktigste forringelsesbakteriene på fiskearter kategorisert etter fettandel og lagret i ulike atmosfærer.

Fettandel		Luft (aerob)	Referanse
Mager	MA-pakket torsk	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Shewanella putrefaciens</i>	(Dalgaard, 2003; Gram, 2009)
	Havkaruss fileter	<i>Pseudomonas</i>	(Parlapani et al., 2015)
	Gylen havarkuss	<i>Pseudomonas</i>	(Tryfinopoulou et al., 2002)
	Torsk (<i>G. morhua</i>)	H ₂ S produserende bakterier	(Sveinsdottir et al., 2002)
	Okseøyefisk (Boops boops)	<i>Pseudomonas</i> , <i>Shewanella putrefaciens</i>	(Koutsoumanis & Nychas, 1999)
Fet	Aerob lagret laks (<i>Pseudoparesis semifasciata</i>)	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Shewanella putrefaciens</i>	(Hozbor et al., 2006)
MAP (CO₂, N₂, O₂) og vakuum			
Mager	MA-pakket Sei (<i>Pollachius virens</i>)	<i>P. phosphoreum</i>	(Lerfall et al., 2018) (Lerfall et al., 2022; Rudi et al., 2004)
	MAP lagrede torskefileter	<i>P. phosphoreum</i>	(Dalgaard et al., 1993)
	Vakuum/MAP lagrede torskefileter	<i>P. phosphoreum</i>	(Dalgaard, 1995)
Halvfet	MAP lagret rød mullet (<i>Mullus barbatus</i>) (mediterran)	Melkesyrebakterier; <i>Lactobacillus</i> , <i>Carnobacterium</i> og <i>B. thermosphacta</i>	(Koutsoumanis et al., 2000)
	MA-pakket kveite (<i>Hippoglossus hippoglossus</i>)	<i>Photobacterium phosphoreum</i> <i>Pseudomonas</i> spp.	(Hovda et al., 2007)
Fet	Vakuum pakket laks	Melkesyrebakterier, <i>Lactococcus piscium</i> Psykrotolerant Enterobacteriaceae f.eks. <i>Serratia</i> <i>sp.</i>	(Macé et al., 2012)
	MAP/vakuum laks	<i>B. termosphakta</i>	(Macé et al., 2012; Rudi et al., 2004)
	MA-pakket laks	Melkesyrebakterier, <i>Carnobacterium</i> spp.,	(Macé et al., 2013)
	MA-pakket laks	<i>P. phosphoreum</i> <i>C. piscicola</i>	(Emborg et al., 2002)
	MA-pakket laks	Psychrotolerant Enterobacteriaceae; f.eks. <i>Hafnia alvei</i>	(Dalgaard, 2005; Macé et al., 2013)

2.3 *Photobacterium* spp.

Photobacterium spp. er gram-negative og oksidase positive bakterier som tilhører *Vibrionaceae*-familien. De er aerobe og fakultativ anaerob og i stand til å omdanne nitrat til nitritt. Som primær karbonkilde utnytter de glukose og som hoved-nitrogenkilde utnytter de ammonium (NH_4^+). Slekten er ikke-endosporedannende og forekommer mest som coccobaciller og noen ganger som staver. Cellene er små, og de fleste er dekket med en til tre polare flageller som de bruker til bevegelse. Størrelsen på cellene varierer mellom 0,8-1,3 μm i diameter og 1,8-2,4 μm i lengde. (Farmer & Hickman-Brenner, 2006)

Per i dag er 27 gyldige arter og 2 underarter registrert hvorav *P. angustum* (noen stammer), *P. aquimaris*, *P. damsela* (noen stammer), *P. kishitanii*, *P. leiognathi*, *P. mandapamensis* og *P. phosphoreum* har evnen til generering av bioluminescens (Labella et al., 2017; Parte, 2014; Urbanczyk et al., 2011). Generering av bioluminescens har blitt observert til å være høyest ved rundt 15 °C (Kuts & Ismailov, 2009).

Normalt vokser *Photobacterium* spp. ved en pH mellom 6-9 og over et bredt temperaturområde på 2-34 °C (Bjornsdottir-Butler et al., 2016; Dalgaard et al., 1997; Figge et al., 2014) med en varierende optimumtemperatur på mellom 18-25 °C, avhengig av art (Moi et al., 2017). Eksempelvis vokser stammer av *P. kishitanii* mellom 5 og 29 °C, med en optimal vekst ved 26 til 27 °C, mens *P. angustum* stammer vokste mellom 5 og 34 °C, med optimal vekst ved 32 °C (Bjornsdottir-Butler et al., 2016). *Photobacterium* slekten vokser videre ved både relativt lave og høye saltkonsentrasjoner på 0-7 % NaCl (Figge et al., 2014). Optimum saltkonsentrasjon for vekst ligger mellom 1-3 % og varierer mellom forskjellige arter. Bjornsdottir-Butler et al. (2016) og Watanabe & Hastings (2004) dokumenterte at 1 % NaCl er optimalt for *P. kishitanii*, 2 % NaCl for *P. angustum* og både 1 og 3 % for *P. phosphoreum*.

Photobacterium stammer har sitt naturlige reservoar i det marine miljøet, inkludert marine sedimenter, kyst nære områder, på overflaten og i tarmen til fisk og fotofor organer til marine fiskearter. (Dalgaard, 1995; Mathew et al., 2015; Urbanczyk et al., 2011) Isolater har også blitt isolert fra marine organismer som blekksprut, østers og krabber, i tillegg til MA-pakket fisk til konsum og kvalitetsforringet pakket fisk. En oversikt over *Photobacterium* arter med habitat og geografisk opprinnelse vises i tabell 4. Den store variasjonen i isolasjonskilder fra det marine miljøet indikerer at bakteriene har stor tilpasningsdyktighet (Farmer & Hickman-Brenner, 2006).

Tabell 4: Oversikt over *Photobacterium* arter med habitat og geografisk opprinnelse (Urbanczyk et al., 2011).

Art	Habitat	Geografisk kilde	Referanse
<i>P. angustum</i>	Sjøvann	Hawaii; Guaymas-bassenget, Mexico	(Reichelt et al., 1976; Urbanczyk et al., 2011)
<i>P. aplysiæ</i>	Egg fra Anaspidea	Mogiyeo Island, Korea	(Seo et al., 2005)
<i>P. aquimaris</i>	Sjøvann	Sagami Bay, Japan	(Yoshizawa et al., 2009)
<i>P. damsela</i>	Lesjoner av fisk	Chesapeake Bay, Maryland	(Gauthier et al., 1995; Kimura et al., 2000; Ruimy et al., 1994)
<i>P. frigidophilum</i>	Dyphavssediment	Edison Seamount, Stillehavet	(Seo et al., 2005)
<i>P. gaetbulicola</i>	Tidevanns sedimenter	Sør-Korea	(Kim et al., 2008)
<i>P. ganghwense</i>	Sjøvann	Ganghwa Island, Sør-Korea	(Park et al., 2006)
<i>P. halotolerans</i>	Saltsjøvann	Lake Martel, Mallorca, Spania	(Rivas et al., 2006)
<i>P. iliopiscarium</i>	Fiskens tarmkanal, forringet kjøtt	Norge; Danmark	(Onarheim et al., 1994; Urakawa et al., 1999) (Flodgaard et al., 2005) (Ast & Dunlap, 2005)
<i>P. indicum</i>	Sediment	Indiske hav	(Ivanova et al., 2004)
<i>P. jeanii</i>	Koraller, Zoantharia	Brasil; Australia	(Chimetto et al., 2010)
<i>P. kishitanii</i>	Fiskeskinn, dyphavsfisk symbiot	Japan; Stillehavet, Atlanterhavet og indiske hav	(Altieri et al., 2005; Ast et al., 2007)
<i>P. leiognathi</i>	Kyst SW, fisk og blekksprut symbiot	Thailand; Japan	(Boisvert et al., 1967) (Kaeding et al., 2007) (Fukasawa & Dunlap, 1986)
<i>P. lipolyticum</i>	Tidevannssone sediment	Gulehavet, Korea	(Yoon et al., 2005)
<i>P. lutimaris</i>	Tidevanns sediment	Sør-Korea	(Jung et al., 2007)
<i>P. mandapamensis</i>	Kystsjøvann, fiskesymbiot	India; Florida; Japan	(Kaeding et al., 2007) (Dunlap et al., 2009; Hendrie et al., 1970; Wada et al., 2006)
<i>P. phosphoreum</i>	Åpent havvann, skinn av fisk	Alaska; Stillehavet og Atlanterhavet	(Ast & Dunlap, 2005; Budsberg et al., 2003)
<i>P. profundum</i>	Dyphavs Amfipoder, dyphavs sediment	Suluhavet; Ryukyu-grøften	(Bartlett & Welch, 1995) (DeLong et al., 1997; Nogi et al., 1998)
<i>P. rosenbergii</i>	Koraller	Magnetic Island, Australia	(Thompson et al., 2005)
<i>P. swingsii</i>	Østers og krabbehemolymfe	Mexico; Spania	(Gomez-Gil et al., 2011)
<i>P. aestuarii</i>	Tidevanns sediment	Yeongam Bay (R. Korea)	Yeongam Bay (R. Korea)
<i>P. aphoticum</i>	Sjøvann	Malvarrosa-stranden, Valencia (Spania)	(Labella, Castro, Manchado, Lucena, et al., 2018)
<i>P. aquae</i>	Epinephelus malabaricus (<i>Malabar grouper</i>) MariCulture	Tianjin (China)	(Liu et al., 2014)
<i>P. galathea</i>	Blåskjell	Salomon Havet (Salomonøyene)	(Machado et al., 2015)
<i>P. panuliri</i>	Egg fra pigghummer (<i>Panulirus penicillatus</i>)	Andamanhavet (India)	(Deep et al., 2014)
<i>P. sanctipauli</i>	Korall (<i>Madracis decactis</i>)	St. Peter & St. Paul Archipelago (Brasil)	(Moreira et al., 2014)
<i>P. sanguinancreri</i>	Krabbe (<i>Maja brachydactyla</i>)	Spania, Nederland	(Gomez-Gil et al., 2016)

2.3.1 *Photobacterium* spp. som forringelsesorganisme

Photobacterium spp. er ofte identifisert som forringelsesorganisme i sjømat og fisk fra kaldere strøk, spesielt i ferske og lett prosesserte produkter pakket i MAP eller vakuum. *P. phosphoreum* er nært beslektet med *P. kishitanii*, *P. aquimaris* og *P. iliopiscarium*, og en av de vanligste artene assosiert med forringelse i magre fiskearter pakket i vakuum eller MAP, spesielt med høye CO₂ konsentrasjoner (> 60 %) (Figge et al., 2014; Lerfall et al., 2018; Olafsdottir et al., 2006). Inhibering av *Photobacterium* spp. i både lettprosessert og fersk fisk kan dermed være en utfordring i fiskeindustrien (E. Reynisson et al., 2009).

Forringelsespotensiale til *Photobacterium* spp. i slike produkter er knyttet til bakterienes evne å vokse ved anaerobe forhold, tolerering for høye CO₂ konsentrasjoner (> 60 %), lave og høye saltkonsentrasjoner (0-7 % NaCl) og lave temperaturer (2 °C). *Photobacterium* har evnen til å vokse under anaerobe forhold ettersom bakteriene kan bruke TMAO som en endelig elektronakseptor ved anaerob respirasjon. Sammenlignet med *S. putrefaciens* produserer *P. phosphoreum* 10-100 ganger mer TMA per celle og har dermed stor forringelsespotensiale (Dalgaard, 1995). Andre potensielle elektronakseptorer for anaerob respirasjon er svovelholdige aminosyrer, som fører til produksjon av hydrogensulfid, metylmerkaptan og dimetyldisulfid (Leroi & Joffraud, 2011). Videre produserer *Photobacterium* spp. biogene aminer, herunder histamin (Bjornsdottir-Butler et al., 2018; Emborg et al., 2005).

P. phosphoreum har blitt identifisert som dominerende forringelsesorganisme i både torsk, sei, hyse og blekksprut, pakket i ulike atmosfærer (Lerfall et al., 2018; Olafsdottir et al., 2006). Økning i antall *P. phosphoreum* bakterier fra 10³ kde/g til uakseptable nivåer for konsum på 10⁷ kde/g er dokumentert gjennom en 16 dagers lagringsperiode i kjølelagret, vakuum- og MAP (40 % CO₂ og 60 % N₂) pakket torsk (Flodgaard et al., 2005). Andre *Photobacterium* arter som *P. piscicola* og *P. iliopiscarium* har blitt identifisert i forringet, MA-pakket torsk av (Ast & Dunlap, 2005; Figge et al., 2014). Videre har forekomst av *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium*, og *P. carnosum* blitt rapportert i flere ulike typer kjøtt med antatt kontaminasjon fra miljøet eller under slakteprosessen. (Nieminen et al., 2016; Stoops et al., 2015) Dette tyder på en svært variert miljøtilpasning og forskjellige opphavskilder til kontaminering av kjøtt og fisk (Fuertes-

Perez et al., 2019). Vekst av *Photobacterium* spp. i lett prosesserte fisk og sjømat produkter diskuteres videre i kapittel (2.5).

2.3.2 Identifisering av *Photobacterium* spp.

Ved identifisering av *Photobacterium* spp. brukes ofte molekylære metoder i kombinasjon med fenotypiske tester. Ettersom *Photobacterium* spp. utnytter mange monosakkarider, disakkarider, glykosider og noen alkoholholdige sukkerarter kan isolater kultiveres på mange generelle vekstmedier. De fleste mediene tilsettes 0,5-5,0 % NaCl for å oppnå normal vekst og generering av bioluminescens (Moi et al., 2017). Selv om glukose er hoved karbonkilden kan noen stammer også bruke forskjellige aminosyrer som glutaminsyre, serin, alanin og leucin til å syntetisere karbon og indikerer veksten av mange marine bioluminescens dannende *Photobacterium* stammer (Brenner et al., 2005).

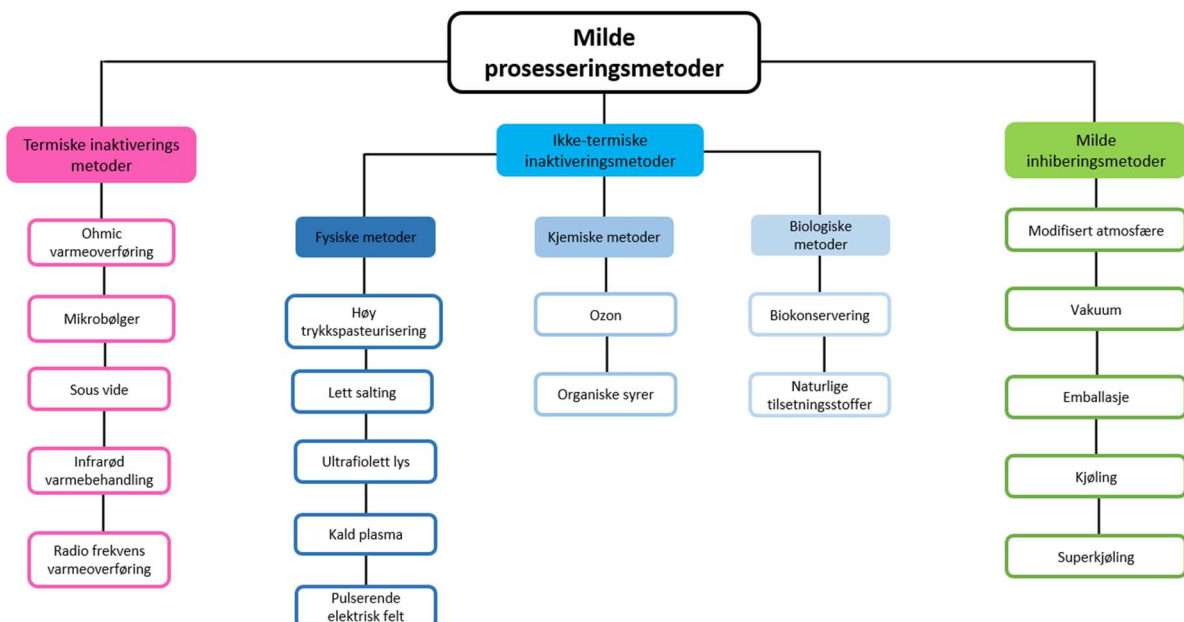
For genotypisk identifisering av *Photobacterium* spp. er 16S rRNA sekvensering, multilokus sekvensanalyse (MLSA) og multilokus sekvens typing (MLST) mye brukte metoder (Boziaris & Parlapani, 2017; Figge et al., 2014; Kanki et al., 2007). Molekylære metoder har som fordel at det er mulig å identifisere både dyrkbare og ikke-dyrkbare mikroorganismer direkte fra prøven (Anagnostopoulos et al., 2022), slik at større nøyaktighet oppnås i analyseresultatene. Ved flere studier har molekylære metoder påvist dominerende forringelsesorganismer i fisk, som ikke ble oppdaget ved kulturavhengige metoder (Parlapani et al., 2013). 16S rRNA analyseringen omfatter vanligvis bruk av universelle primere til avlesning av en hypervariabel region av 16S rRNA-genet (f.eks. V1–V4). Etter sekvensering kan sekvensene sammenlignes med tidligere analyserte sekvenser. (Janda & Abbott, 2007; Nygaard, 2017)

16S rRNA sekvensanalyse har imidlertid ikke vært tilstrekkelig til å skille mellom nært beslektede arter som *P. kishitanii*, *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* og *P. aquimaris* og brukes derfor ofte i kombinasjon med MLSA (Urbanczyk et al., 2011). MLSA er en nyere metode som innebærer genotypisk karakterisering ved bruk av sekvensene til flere proteinkodende gener (f.eks. *gyrB*, *luxA*, *pyrA*, *recA*, *ftsZ*, *topA*, *mreB* og *gapA*) og påfølgende fylogenetisk analyse av genenes sammensatte sekvenser. Dette har resultert i vellykket identifisering på artsnivå og kartlegging av genetiske forhold mellom nært beslektede arter (Tindall et al., 2010). Mye brukte gener er *gyrB*, *luxA*, *pyrA*, *recA*, *ftsZ*, *topA*, *mreB* og *gapA* (Labella, Castro, Machado, & Borrego, 2018).

2.4 Lettprosessering av sjømat

Blant forbrukere er det en økende etterspørsel etter naturlige fisk- og sjømatprodukter av høy kvalitet og med lite tilsetningsstoffer. Videre ønsker forbrukerne at produkter skal være lett å tilberede og tilgjengelig i forbrukervennlige størrelser og detaljpakninger. I Norge finner vi et flertall av sjømatprodukter som faller under denne kategorien. Herunder sjømatprodukter i porsjonsstørrelse som lettsaltet filetert laks eller torsk i MAP eller vakuum forpakning som skal oppbevares og distribueres under kjøletemperatur (4 °C). (Asioli et al., 2017; Carlucci et al., 2015) For å tilby rødspette som enkle og forbrukervennlige produkter er det dermed aktuelt å anvende milde inhiberingsmetoder som kjøling, MAP og vakuum (Adhikari et al., 2021; Mueller Loose et al., 2013).

Anvendelsen av slike milde prosesseringsmetoder i fisk- og sjømatprodukter har som fordel at de bevarer næringsinnholdet og råstoffegenskapene i størst mulig grad, slik at produktene når forbrukeren med ferskest mulig kvalitet. Samtidig er hensikten med bruk av disse metodene å forlenge produktets holdbarhet og sikre trygge produkter ved å helt eller delvis hemme mikrobiell forringelse og patogene mikroorganismer (Abel et al., 2022). En oversikt over flere milde prosesseringsteknologier som brukes på sjømatprodukter presenteres i figur 2 (Abel et al., 2022).



Figur 2: Eksempler på milde prosesseringsmetoder ofte anvendt på sjømat, med kategorisering etter termiske- og ikke-termiske inaktiveringsmetoder samt milde inhiberingsmetode. Figuren er basert på (Abel et al., 2022).

2.5 Barriereteknologi

Lett prosesserte fiskeprodukter er imidlertid svært utsatt for mikrobiell og enzymatisk forringelse, slik at anvendelsen av en barriere ofte ikke sikrer god nok mattrygghet og holdbarhet fram til siste forbruksdag. Vanligvis kombineres derfor to eller flere barrierer for å oppnå en maksimal inhiberende effekt på mikrobiotaen i produktet. Dette konseptet defineres som barriereteknologi (Leistner, 2000) og skal sikre at bakterier ikke er i stand til å overvinne de anvendte barrierene som blir brukt langs hele verdikjeden. Inhibering av bakteriene oppnås ved at de må bruke energi på hver barriere til å opprettholde deres indre nivå av pH og osmotisk trykk. (Gonçalves et al., 2011; Pal et al., 2021) De vanligste hinderteknologiene for matkonservering er høy eller lav temperatur, vannaktivitet (a_w), konserveringsmidler (som nitritt, sulfitt, sorbat), surhet (pH) og konkurrerende mikroorganismer (hovedsakelig melkesyrebakterier) (Tsironi et al., 2020). For å sikre trygge produkter kreves videre et stort fokus på råvarekvalitet, iboende matvareegenskaper (f.eks. vannaktivitet og pH), temperaturkontroll, emballasje, produksjonshygiene og krysskontaminasjon (Hao et al., 2021).

2.5.1 Kjøling

Lav temperatur regnes som den viktigste faktoren for å øke fiskens holdbarhet fra fangst til forbruker (Abel et al., 2022). Kjøling av fersk eller lett prosessert fisk på 0-4 °C er dermed en av de viktigste barrierene mot mikrobiell og enzymatisk aktivitet og essensielt for bevaring av produktkvalitet i lengst mulig tid. For å utsette kvalitetsreducerende prosesser er gjennomgående temperaturkontroll langs hele verdikjeden inkludert lagring og distribusjon derfor av stor betydning (Gökoğlu & Yerlikaya, 2015). En økning i temperaturen på 4 °C kan allerede doble nedbrytningshastigheten og omtrent halvere holdbarheten til fisk (Šimat & Mekinić, 2019).

Under kjølelagring er psykrotolerante mikroorganismer som *S. putrefaciens* og *Photobacterium* spp. de viktigste forringelses organismene (Lerfall et al., 2022). Sammenlignet med høyere temperaturer har 4 °C eller lavere vist å ha en betydelig hemmende effekt på vekst av *Photobacterium* spp. Samtidig har *P. phosphoreum* også blitt påvist ved temperaturer på 0-3,6 °C (E. Reynisson et al., 2009), slik at det viser at lave temperaturer alene ikke fullstendig inhiberer vekst. Dette belyser at kombinasjonen med andre milde hemmende barrierer kan være nødvendig for å oppnå en tilstrekkelig inhiberende effekt mot mikrobiell aktivitet for å utvide holdbarhetstiden (Olafsdottir et al., 2006).

2.5.2 MAP

Modifisert atmosfære pakking (MAP) er en stadig viktigere barriere i kombinasjon med kjøling for fisk- og sjømatprodukter. Ved bruk av MAP endres atmosfæren i produktemballasjen til en gassblanding som inneholder ulike konsentrasjoner CO₂, O₂ og N₂. Dette bidrar til reduserte kvalitetsendringer gjennom inhibert mikrobiell aktivitet og ved å utsette oksidative reaksjoner (Boziaris, 2014). Økt konsentrasjon av CO₂ og redusert konsentrasjon av O₂ i pakkegassen reduserer mikrobiell vekst. CO₂ er den viktigste gassen basert på dens inhiberende effekt mot forringelsesbakterier i luft, herunder *Pseudomonas* og *Shewanella putrefaciens* (Sivertsvik et al., 2003). Nitrogen fungerer som et nøytralt og smaksløs erstatningsgass for oksygen og hindrer samtidig vakuumeffekten som kan forårsakes av for høye CO₂ konsentrasjoner.

Tilsetning av høyere oksygen konsentrasjoner (> 10 %) hindrer at fakultativ anaerobe forringelsesbakterier som *Shewanella* spp. og *Photobacterium* spp. bruker TMAO som endelig elektronakseptor ved anaerob oksidasjon (Dalgaard et al., 2006). For magre fiskearter med et høyt innhold av TMAO kan eksempelvis gassblandinger brukes med AP, 60 % CO₂ og 40 % O₂ eller N₂ (Hansen et al., 2007). Tilsetning av oksygen til fete fiskearter kan derimot medføre oksidativ harskning, slik at MA-pakking av fet fisk vanligvis består av 60 % CO₂ og 40 % N₂ (Maria et al., 2009; Sivertsvik, 2007).

Sammenlignet med luftlagring har flere forsøk vist en utvidet holdbarhetstid på opptil 3 uker ved anvendelse av MA-pakking med et CO₂ innhold på 30-60 % (Sivertsvik et al., 2002). Samtidig har *P. phosphoreum* blitt rapportert som viktigste forringelsesorganisme i MAP produkter med høye CO₂ konsentrasjoner (> 60 %) i kombinasjon med kjøling og at disse prosessforholdene ikke var tilstrekkelig til å hemme vekst av *P. phosphoreum* (Emborg et al., 2002; Hansen et al., 2007; Lerfall et al., 2022).

2.5.3 Salt

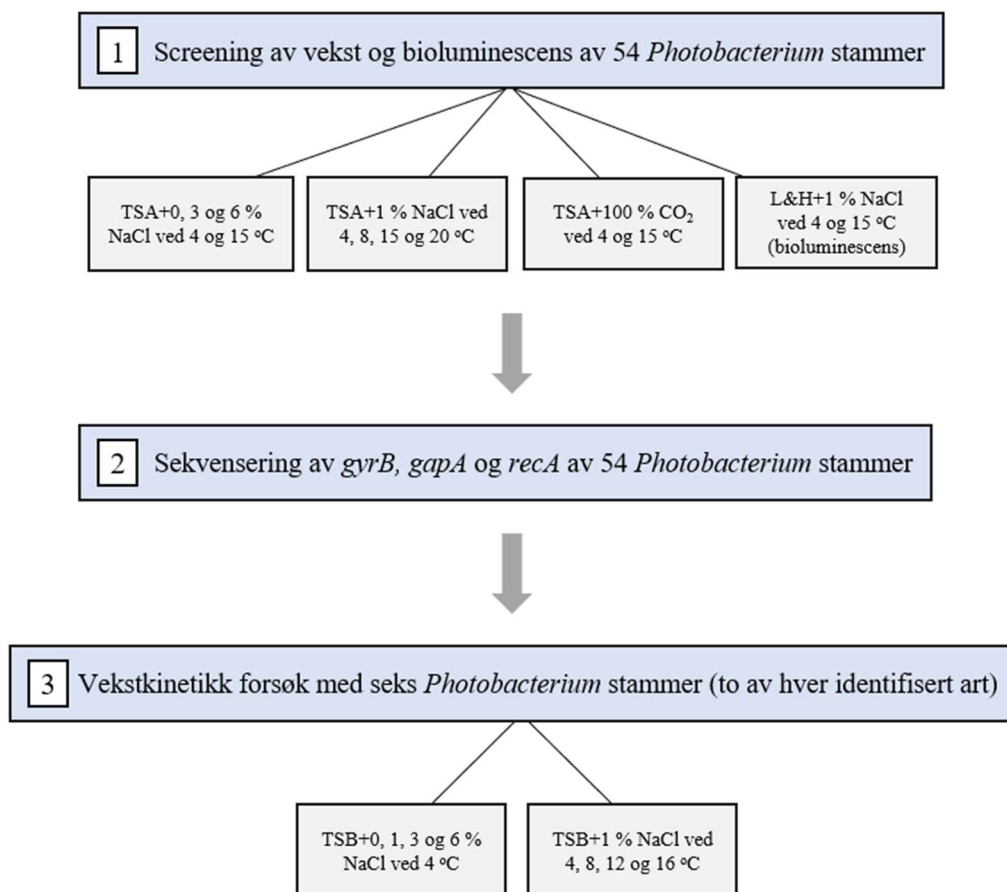
Tilsetting av natriumklorid til matvarer har en konserverende effekt ved at det trekker vann ut av fiskekjøttet og dermed reduserer vannaktivitet og pH i produktet med en resulterende inhibering av mikrobiell vekst og reduksjon av funksjonelle egenskaper (Stringer & Pin, 2005). Videre er saltets viktigste funksjon å gi smak til maten (Nielsen et al., 2020). Imidlertid er det strengere krav om reduksjon av salttilsetning i matvarer ettersom et høyt inntak gir økt risiko for hjerte- og karsykdommer. For å forbedre folkehelsen anbefaler (WHO, 2020) å senke det daglige inntaket på rundt 9-12 g hos de fleste voksne i dag, til mindre enn 5 g per dag (2 g

natrium). For lett saltede fiskeprodukter er saltmålet 1,4 % NaCl (Helsedirektoratet, 2019). Dette kan by på utfordringer knyttet til mikrobiell vekst av patogene- og forringende mikroorganismer med økt toleranse for salt. (Dahl et al., 2019)

Dette inkluderer mikrobiell vekst av *Photobacterium* spp. basert på dens optimale vekst ved 1-3 % og høy toleranse av noen stammer på opptil 5 og 6 % NaCl (Bjornsdottir-Butler et al., 2016; Figge et al., 2014; Watanabe & Hastings, 2004). Salttoleransen over et bredt spekter er basert på *Photobacterium* slektens naturlige forekomst i ulike habitater med krav om stor tilpasningsdyktighet. Dette til både lave konsentrasjoner (24–26 ‰) i Kvitsjøen (Kuts & Ismailov, 2009) og høye konsentrasjoner (5-6 %) i Nordsjøen og det Japanske havet (Makiguchi et al., 1980; Waters & Lloyd, 1985). I fersk eller lettprosessert rødspette til konsum og lignende produkter som lettsaltet torsk befinner saltprosenten seg på ca. 0,4-2,0 % NaCl (Helsedirektoratet, 2019; E. Reynisson et al., 2009). I torsk med 0,4 og 2,5 % NaCl var *Photobacterium* eksempelvis den dominerende bakterieslekten (Eyjólfur Reynisson et al., 2009). I lett saltede produkter er dermed flere bakterier være nødvendig mot *Photobacterium* spp. for å oppnå en utvidet holdbarhetstid.

3 Material og metode

Det praktiske arbeidet omfattet en mikrobiell screening av 54 *Photobacterium* stammer ved ulike inkuberingstemperaturer (4, 8, 15 og 20 °C), saltkonsentrasjoner (0, 1, 3 og 6 % NaCl) og CO₂ konsentrasjoner (100 % ved start av inkubering). Dette for fenotypisk karakterisering av stammene basert på deres evne å vokse og generere bioluminescens ved de ulike miljøfaktorene. Videre ble sekvensering av *gyrB*, *gapA* og *recA* genene utført for å identifisere de 54 *Photobacterium* stammene på artsnivå. Vekstkinetikk parametere til seks utvalgte *Photobacterium* stammer ble videre undersøkt ved inkubering i ulike temperaturer (4, 8, 12 og 16 °C) og saltkonsentrasjoner (0, 1, 3 og 6 % NaCl). De seks stammene ble valgt basert på deres artsidentifikasjon ved fylogenetisk analyse for å kartlegge eventuelle forskjeller i vekstkinetikk parametere mellom artene. En oversikt over rekkefølgene på forsøkene som ble gjort er presentert i figur 3.



Figur 3: Oversikt over trinnvis gjennomføring av de tre forsøkene i denne studien.

3.1 Bakterie stammene

Photobacterium stammene i denne oppgaven ble tidligere isolert fra hel rødspette som ble fanget i to ulike sesonger (april og september) og lagret under tre forskjellige lagringsbetingelser; på is (0 °C) i luft, i MAP (70 % CO₂, 20 % N₂, 10 % O₂) ved 4 °C og i vakuum ved 4 °C. Alle stammene ble isolert ved dag 14 i lagringsperioden. Isolatene ble lagret ved -80 °C frem til bruk. Isolatene er presentert i tabell 5.

Tabell 5: Oversikt over *Photobacterium* stammene benyttet i oppgaven, kilde for isolasjon, samt dato for isolasjon og identifikasjonskode. Isolasjonskodene indikerer sesong og isolasjonsatmosfære; «Sm» september og MAP, «Sv» september og vakuum, «Sw» september og luft, «Am» april og MAP, «Av» april og vakuum, og «Aw» april og luft.

Isolasjons kode	Kilde for isolasjon	Isolasjonssesong
Sw30	Luft lagret rødspette	September
Sw35	Luft lagret rødspette	September
Sw36	Luft lagret rødspette	September
Sw26	Luft lagret rødspette	September
Sw28	Luft lagret rødspette	September
Sw32	Luft lagret rødspette	September
Sw25	Luft lagret rødspette	September
Sw27	Luft lagret rødspette	September
Sw31	Luft lagret rødspette	September
Sv37	Vakuumpakket rødspette	September
Sv38	Vakuumpakket rødspette	September
Sv43	Vakuumpakket rødspette	September
Sv40	Vakuumpakket rødspette	September
Sv42	Vakuumpakket rødspette	September
Sv45	Vakuumpakket rødspette	September
Sv44	Vakuumpakket rødspette	September
Sv47	Vakuumpakket rødspette	September
Sv48	Vakuumpakket rødspette	September
Sm51	MA-pakket rødspette	September
Sm53	MA-pakket rødspette	September
Sm60	MA-pakket rødspette	September
Sm50	MA-pakket rødspette	September
Sm58	MA-pakket rødspette	September
Sm59	MA-pakket rødspette	September
Sm49	MA-pakket rødspette	September
Sm52	MA-pakket rødspette	September

Sm57	MA-pakket rødspette	September
Aw66	Luft lagret rødspette	April
Aw83	Luft lagret rødspette	April
Aw87	Luft lagret rødspette	April
Aw70	Luft lagret rødspette	April
Aw76	Luft lagret rødspette	April
Aw90	Luft lagret rødspette	April
Aw71	Luft lagret rødspette	April
Aw75	Luft lagret rødspette	April
Aw81	Luft lagret rødspette	April
Av99	Vakuum pakket rødspette	April
Av106	Vakuum pakket rødspette	April
Av107	Vakuum pakket rødspette	April
Av92	Vakuum pakket rødspette	April
Av93	Vakuum pakket rødspette	April
Av101	Vakuum pakket rødspette	April
Av108	Vakuum pakket rødspette	April
Av114	Vakuum pakket rødspette	April
Av118	Vakuum pakket rødspette	April
Am128	MA-pakket rødspette	April
Am145	MA-pakket rødspette	April
Am150	MA-pakket rødspette	April
Am134	MA-pakket rødspette	April
Am135	MA-pakket rødspette	April
Am139	MA-pakket rødspette	April
Am131	MA-pakket rødspette	April
Am141	MA-pakket rødspette	April
Am147	MA-pakket rødspette	April

3.2 Screeningsforsøk av *Photobacterium* arter ved ulike miljøfaktorer

For å screene vekst av *Photobacterium* artene ved ulike temperaturer, saltkonsentrasjoner og CO₂ konsentrasjoner ble bakteriekulturene oppdyrket fra 54 frosne isolater ved utsåing på Tyrptone soya agar (TSA) (VWR, Belgia). For screening av vekst ved ulike temperaturer ble fire paralleller av hvert isolat utsådd på mediet og henholdsvis inkubert ved 4, 8, 15 og 20 °C. For screening av vekst ved ulike saltkonsentrasjoner ble seks paralleller utsådd på mediet med

0, 3 og 6 % NaCl og inkubert ved 4 og 15 °C. I tillegg ble vekst screenet ved på TSA med 1 % NaCl og 100 % CO₂ indusert atmosfære ved 4, 8, 12 og 15 °C. CO₂ atmosfæren ble generert ved hjelp av Webomatic Supermax-C vacuum machine (Webomatic, Bochum, Germany). Generering av bioluminescens ble analysert ved utsåing på Long and Hammer agar (L&H) og inkubering ved 4, 8, 12 og 16 °C. Tillaging av L&H ble utført i henholdt til NMKL No. 184 (NMKL, 2006), presentert i vedlegg A. En fullstendig oversikt over screeningsforsøket er presentert i tabell 6. Bakterievekst ved inkubering i de ulike saltkonsentrasjonene og temperaturene ble registrert etter 1, 3, 5 og 7 dager og generering av bioluminescens etter 1, 4 og 7 dager. Vekst i CO₂ indusert atmosfære ble registrert etter 2, 4, 7 og 9 dager. For å kontrollere atmosfære forholdet gjennom hele forsøket ble på disse dagene også gass sammensetningen kontrollert ved hjelp av en O₂ og CO₂ måler (Dansensor CheckMate 9000). Registrering av veksten ble gjort ved å subjektivt evaluere antall kolonier på petriskålen med tallene 0, 1, 2 eller 3 (ingen til mye vekst).

Tabell 6: Oversikt over mikrobielt screeningsforsøk.

Miljøfaktor	Medium	Inkuberingstemperatur
• Temperatur	Vekst på TSA + 1 % NaCl	4, 8, 15 og 20 °C
• Bioluminescens	Vekst på Long and Hammer agar	4, 8, 15 and 20 °C
• Saltkonsentrasjon	Vekst på TSA + 0, 3 og 6 % NaCl	4 og 15 °C
• CO ₂	Vekst på TSA + CO ₂ (100 % ved start av inkubering)	4 og 15 °C

3.3 Identifisering av stammer ved PCR amplifisering og sekvensering av *gyrB*, *gapA* og *recA*

3.3.1 DNA ekstrahering

DNA ble ekstrahert ved hjelp av DNeasy® Blood & Tissue (qiagen, Oslo, Norge) og protokollene «Pre-treatment for Gram-Positive Bacteria» og «Purification of total DNA from animal tissue (spin coloumn treatment)». Det ekstraherte DNAet ble oppbevart ved -20 °C.

3.3.2 PCR amplifisering

Til Polymerase Chain Reaction (PCR) ble HotStarTaq® Plus PCR (qiagen, 2010) benyttet. 2 µl DNA ble tilsatt til 23 µl av mastermiksen til hver sin brønn, vist i tabell 7. For negativ kontroll ble det tilsatt 2 µl nukleasefritt vann og 23 µl mastermikse til en egen brønn. Prøvene ble amplifisert med primerparene 22F/1240R, 56F/668R og 10F7643R for henholdsvis regionene DNA-gyrase B-underenhet (*gyrB*), glyceraldehyd-3-fosfatdehydrogenase A (*gapA*) og *recA*.

Tabell 7: PCR mastermikse HotStarTaq® Plus PCR Handbok (qiagen, 2010) til *gyrB*, *gapA* og *recA* sekvensering.

Komponent	(µl)/prøve	Sluttkonsentrasjon
10x PCR Buffer	2,5	1 x
dNTP Mix	0,5	200 µM av hver dNTP
Forward primer	1	0,2 µM
Reverse primer	1	0,2 µM
Hot Star taq polymerase	0,125	2,5 U/per reaksjon
Nukleasefritt vann	17,975	-
Totalt	23	-

Tabell 8: Primersettene som ble benyttet for PCR amplifisering av *gyrB*, *gapA* og *recA* genene.

Gen	Primer	Annealing temperatur	Amplifikasjons lengde	Nukleotidsekvens	Referanse
<i>gyrB</i>	B22F primer	54 °C	1218	5'GAAGTTATCATGACGGTACTTC3'	(Ast et al., 2007)
	1240R primer			5'AGCGTACGAATGTGAGAACC3'	
<i>gapA</i>	56F primer	50 °C	612	5'TGT TGA AGT TGA AGG CGG TA3'	(Figge et al., 2014)
	668R primer			5'GCG GAA AGC CAT ACC AGT TA3'	
<i>recA</i>	10F primer	50 °C	633	5'AGC GTT AGG CCA GAT TGA GA3'	(Figge et al., 2014)
	643R primer			5'CGC CAG TAC GAC GAA TAT CA3'	

PCR-programmet benyttet til DNA amplifikasjonen er fremstilt i tabell 9 og ble utført ved hjelp av BioRad C1000™ Thermal Cycler.

Tabell 9: PCR program til amplifisering av *gyrB*, *gapA* og *recA* genene.

Temperatur (°C)	Tid	Trinn	Antall sykluser
95	15 min	Pre-aktiveringstrinn	
94	1 min	Denaturering	} 36
50*/54^	1 min	Annealing	
72	1 min	DNA-syntese	
72	5 min	Avslutning DNA-syntese	

*Annealing temperatur for *gapA* og *recA* primer

^Annealing temperatur for *gyrB* primer

3.3.3 Gel elektroforese

Kvaliteten og størrelsen til PCR-produktene ble undersøkt ved gjennomføring av agarose gel elektroforese (PowerPac™ Basic Power Supply). Det ble benyttet 1,6 % agarose gel bestående av 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1mM EDTA) og agarose (Lonza, USA). Mengdeforholdet ble tilpasset aktuell størrelse av støpeformene. Etter smelting og nedkjøling ble løsningen tilsatt 8 µl GelRed™ Nucleic Acid stain (qiagen, 2010). 5 µl av hvert PCR-produkt ble blandet med 1 µl loading 6x loading dye (Thermo scientific™) og satt ned i brønnene i gelen. Deretter ble 5 µl GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder (Thermo scientific™) ble

tilsatt i første og siste brønn i gelen som størrelsesmarkør. Gel elektroforesen ble kjørt i 1 time ved 90 volt. Deretter ble gelen avlest under UV-lys i en G:BOX (SynGene, UK) med tilhørende program GeneSys software.

3.3.4 Sekvensering

PCR produktene ble rensert ved bruk av GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific: Cat K0702) i henhold til «User Guide: GeneJET Purification Kit» før produktene ble kvantifisert på en micro-volumplate (take3-plate). Av hver prøve ble 2 µl avsatt på platen for å avlese absorbansen ved en bølgelengde på 260 og 280 nm. Avlesningene ble gjort ved bruk av BioTek PowerWave XS Microplate spektrofotometer ved hjelp av Gen 5™ Software programmet. Et forhold på 260/280 nm i området 1,8-2,0 ble ansett som akseptabelt med hensyn på renheten til DNA. Et lavere tall kan indikere forurensing av kontaminanter som proteiner og fenoler (Thermo Scientific, 2015). I henholdt til Eurofins sine retningslinjer for sekvensering ble kravet for konsentrasjonen av de rensede PCR produktene satt til 25 ng/µl (Eurofins Genomics, 2022). Prøver med høyere konsentrasjoner ble fortynnet med nukleasefritt vann til en konsentrasjon på 25 µl. Deretter ble 5 µl av de rensede PCR-produkt overført til nye sentrifugerør og tilsatt 5 µl forward primer (5 µM) (B22F til *gyrB* sekvenser, 56F til *gapA* sekvenser og 10F til *recA* sekvenser). Prøvene ble sekvensert av Light Run, Eurofins Genimics (Tyskland).

Ved hjelp av DNA Baser Assembler ble det generert en FASTA fil med sekvensene fra hvert gen (*gyrB*, *gapA* og *recA*). 16S rRNA sekvenser ble generert ved en tidligere PCR analyse av 16S rRNA genet av alle 54 *Photobacterium* stammene av det tilknyttede Ph.D. forsøket av Dionysios Tsoukalas ved NTNU. Disse 16S rRNA sekvensene ble inkludert i sekvens analysen i denne oppgaven. I MEGA X dataprogrammet ble sekvenssammenstillinger av sekvensene utført ved bruk av Multiple Sequence Comparison av Log-Expectation (MUSCLE) funksjonen (Kumar et al., 2016). Forskjeller i sekvenslengden ble manuelt tilpasset ved å fjerne enkelte sekvensdeler på begge endene. Tidligere rapporterte gensekvenser (referanse stammer) ble lastet ned fra GenBank. GenBank tilgangsnummer til sekvensene som er brukt i denne oppgaven er presentert i vedlegg B. 16S rRNA, *gyrB*, *gapA* og *recA* sekvensene ble sammenlignet med sekvenser fra databasen BLAST (National Center for Biotechnology Information, 2021). I MEGA X ble neighbour-joining bootstrap metoden (Saitou & Nei, 1987) brukt til å konstruere åtte fylogenetiske trær. Fire av disse ble basert på sammensatte sekvenser av flere husholdningsgene og fire basert på et gen hver. Alle sekvensene ble inkludert i sekvenssammenstillingene.

3.4 Vekstkinetikk forsøk

Seks *Photobacterium* stammer, presentert i tabell 10 ble valgt for å analysere vekstkinetikk parameterer. Det ble valgt to stammer av hver fylogenetisk identifisert artsgruppe basert på resultatene i kapittel (5.1.1). Fra hver art ble to stammer valgt med forskjellig mye vekst for å videre undersøke eventuelle forskjeller i vekstkinetikk parametere innen hver artsgruppe.

Tabell 10: Oversikt over *Photobacterium* stammene som ble brukt til vekstkinetikk forsøket.

Isolasjons-ID	Identifisert art
• Aw66	<i>P. iliopiscarium</i>
• Am135	<i>P. iliopiscarium</i>
• Av108	<i>P. phosphoreum</i>
• Sw30	<i>P. phosphoreum</i>
• Sm58	<i>P. piscicola</i>
• Sv37	<i>P. piscicola</i>

Stammene ble dyrket på TSA ved 15 °C i 48 timer. Av hver stamme ble en bakteriekultur tilsatt 13 ml TSB med 1 % NaCl for å dyrke dem ved 15 °C i 24 timer. For å starte med lik bakteriekonsentrasjon, ble inokulmene justert til lik optisk tetthet på 0,2. Inokulum med høyere eller lavere optisk tetthet ble fortynnet med TSB til en optisk tetthet på 0,2. Deretter ble tre paralleller laget for hver stamme med 0,3 ml forkultur tilsatt 29,7 ml TSB (30 ml totalt volum). For å analysere stammenes vekstkinetikk i ulike temperaturer ble tre paralleller av hver stamme henholdsvis inkubert ved 4, 8, 12 og 16 °C. For å analysere vekstkinetikken i ulike saltkonsentrasjoner ble det tillaget TSB med 0, 1, 3 og 6 % NaCl. Tre paralleller av hver stamme ble henholdsvis inkubert i de fire ulike saltkonsentrasjonene og inkubert ved 4 °C. Umiddelbart etter inokuleringen ble optisk tetthet målt ved 600 nm med et UV-spektrofotometer (UV-1800 Shimadzu). Deretter ble optisk tetthet av prøvene målt hver 3. time til stasjonærfasen ble nådd. Prøvene ble fortynnet når den optiske tettheten ble målt til OD 0,6. Ved syv OD-målepunkter ble også pH målt (Testo 206, Tyskland) av alle parallellene med den siste målingen etter 75 timer.

3.5 Databehandling og statistiske analyser

For vekstkinetikk forsøket med ulike saltkonsentrasjoner og temperaturer ble DMFit applikasjonen i Combase ble benyttet til å estimere vekstkinetikk parametere. For hvert målepunkt ble tre paralleller av hver prøve analysert. De log-transformerte gjennomsnittlige bakteriekonsentrasjonene ble tilpasset vekstmodellen av Baranyi og Roberts (Baranyi & Roberts, 1994) til å estimere maksimal veksthastighet per time (μ_{maks}), lag fase (log kde/ml), startkonsentrasjon (log kde/ml) og sluttkonsentrasjon (Y_{maks}).

Statistiske analyser ble utført i Statistical Package for the Social (SPSS) (versjon 27, IBM, Armonk, NY). For å finne statistiske forskjeller i alle vekstparameterne ble enveis ANOVA ($p < 0,05$) Tukey's-b Post Hoc test gjennomført på log-transformerte kintall-verdier (kde/ml).

De maksimal veksthastighet parameterne ble videre brukt til å genere en sekundær vekstmodell (Ratkowsky et al., 1982). I denne uttrykker den lineære regresjonslinjen forholdet mellom veksthastighet og temperatur for *Photobacterium* stammene. Stigningstallet (b), temperaturen (T) og teoretisk minimumstemperaturen (T_{min}) til den sekundære vekstmodellen er gitt i formelen som vises nedenfor (Ratkowsky et al., 1982). Med formelen kan det også beregnes teoretisk veksthastighet ved andre temperaturer enn 4, 8, 12 eller 16 °C.

$$\mu = (b(T - T_{min}))^2$$

For å beregne signifikansnivået på pH-endring over tid av *Photobacterium* stammene ble Tukey's-b Post Hoc test utført på ANOVA ($p < 0,05$) i SPSS. I tillegg ble Pearsons korrelasjon (tosidig) benyttet til å beregne om det er en signifikant korrelasjon mellom veksthastighet og endring av pH over tid for *Photobacterium* stammene.

For screeningsforsøket ble ANOVA ($p < 0,05$) Tukey's-b Post Hoc benyttet for å se om det er signifikante forskjeller mellom vekst av stammer som ble isolert fra forskjellige isolasjonskilder (sesong og atmosfære) og mellom stammer som ble identifisert som forskjellige arter. Excel ble benyttet for å utføre uparet t-test, $p < 0,05$).

4 Resultater

4.1 Artsdiversitet hos *Photobacterium* stammene

For å identifisere 54 *Photobacterium* stammer (tidligere klassifisert ved sekvensering av 16S rRNA genet) på artsnivå, ble sekvensanalyse av 16S rRNA og husholdningsgenene *gyrB*, *gapA* og *recA* benyttet.

Det ble påvist et absorbans forhold på 260/280 nm i et område på 1,8-2,1 for alle PCR-produktene av 16S rRNA, *gyrB*, *gapA* og *recA*. Dette indikerer god renhet på PCR produktene. I gel elektroforesen ble positive DNA bånd identifisert ved ca. 1200 bp for *gyrB*, 600 bp for *gapA* og 600 bp for *recA*. 16S rRNA-sekvensene som ble benyttet i denne studien var tidligere verifisert av stipendiat D. Tsoukalas. En oversikt over resultater fra gel elektroforesen er presentert i vedlegg C.

4.1.1 Identifisering av stammer basert på 16S rRNA, *gyrB*, *gapA* og *recA* sekvenser

Sekvensering av 16S rRNA og sammenligning av sekvenser mot GenBank-databasen resulterte i at 54 *Photobacterium* stammene ble identifisert som fire ulike arter; *P. phosphoreum* (26 stammer), *P. piscicola* (12 stammer), *P. carnosum* (10 stammer) *P. kishitanii* (6 stammer) (tabell 11).

Sekvensering av alle husholdningsgenene (*gyrB*, *gapA* og *recA*) og sammenligning av sekvenser mot GenBank-databasen resulterte at de 54 *Photobacterium* stammene ble identifisert som tre ulike arter; *P. phosphoreum* (22 stammer) *P. iliopiscarium* (29 stammer) og *P. piscicola* (3 stammer). Det var ikke samsvar mellom identifikasjon på artsnivå for sekvensering av 16S rRNA og husholdningsgenene for 65 % av stammene.

Tabell 11: Artsidentifikasjon av Photobacterium isolater fra rødspette basert på sekvensering av 16S rRNA, gyrB, gapA, recA. Angitt er Query cover % (prosentvis likhet mellom pP- fragment og NCBI sekvens), ID % (identifikasjonsprosent). Stammenes farge indikerer hvilken art de ble klassifisert som basert på blast resultatene av hvert enkelt gen (16S rRNA, gyrB, gapA og recA); (rød) P. phosphoreum, (lilla) P. kishitanii, (blå) P. piscicola, (grønn) P. iliopiscarium og (gul) P. carnosum.

Am141	<i>P. phosphoreum</i>	99	99,73	<i>P. iliopiscarium</i>	99	99,82	<i>P. iliopiscarium</i>	98	100	<i>P. iliopiscarium</i>	99	99,07
Av92	<i>P. kishitanii</i>	95	99,81	<i>P. iliopiscarium</i>	99	98,82	<i>P. iliopiscarium</i>	96	100	<i>P. iliopiscarium</i>	99	100
Am139	<i>P. kishitanii</i>	97	99,81	<i>P. iliopiscarium</i>	100	99,82	<i>P. iliopiscarium</i>	98	100	<i>P. iliopiscarium</i>	99	100
Av118	<i>P. kishitanii</i>	97	99,81	<i>P. iliopiscarium</i>	99	99,82	<i>P. iliopiscarium</i>	100	100	<i>P. iliopiscarium</i>	99	99,10
Sv37	<i>P. phosphoreum</i>	99	99,73	<i>P. piscicola</i>	99	99,82	<i>P. piscicola</i>	99	100	<i>P. piscicola</i>	98	99,82
Sm53	<i>P. phosphoreum</i>	99	99,62	<i>P. piscicola</i>	100	98,81	<i>P. piscicola</i>	99	99,60	<i>P. piscicola</i>	98	100
Sm58	<i>P. phosphoreum</i>	99	99,90	<i>P. piscicola</i>	100	99,27	<i>P. piscicola</i>	100	98,52	<i>P. piscicola</i>	98	99,82

4.1.2 Fylogenetisk analyse

Etter PCR-amplifisering av sekvensregioner i 16S rRNA, *gyrB*, *recA* og *gapA* genene, ble nukleotidsammenstillinger gjennomført i MEGA X. Alle sekvensene til 16S rRNA, *gyrB*, *gapA* og *recA* genene ble deretter benyttet til å konstruere fylogenetiske trær basert på enkeltsekvenser og fra sammensatte sekvenser. Dette for å analysere evolusjonære forhold mellom alle 54 isolatene. 9 gensekvenser (referansestammer presentert i vedlegg B) for hvert gen ble lastet ned fra GenBank og inkludert i den fylogenetiske analysen. Fylogenetiske trær ble konstruert ved neighbour-joining metoden og med 1000 bootstrap replikasjoner for å vurdere påliteligheten til de fylogenetiske trærne.

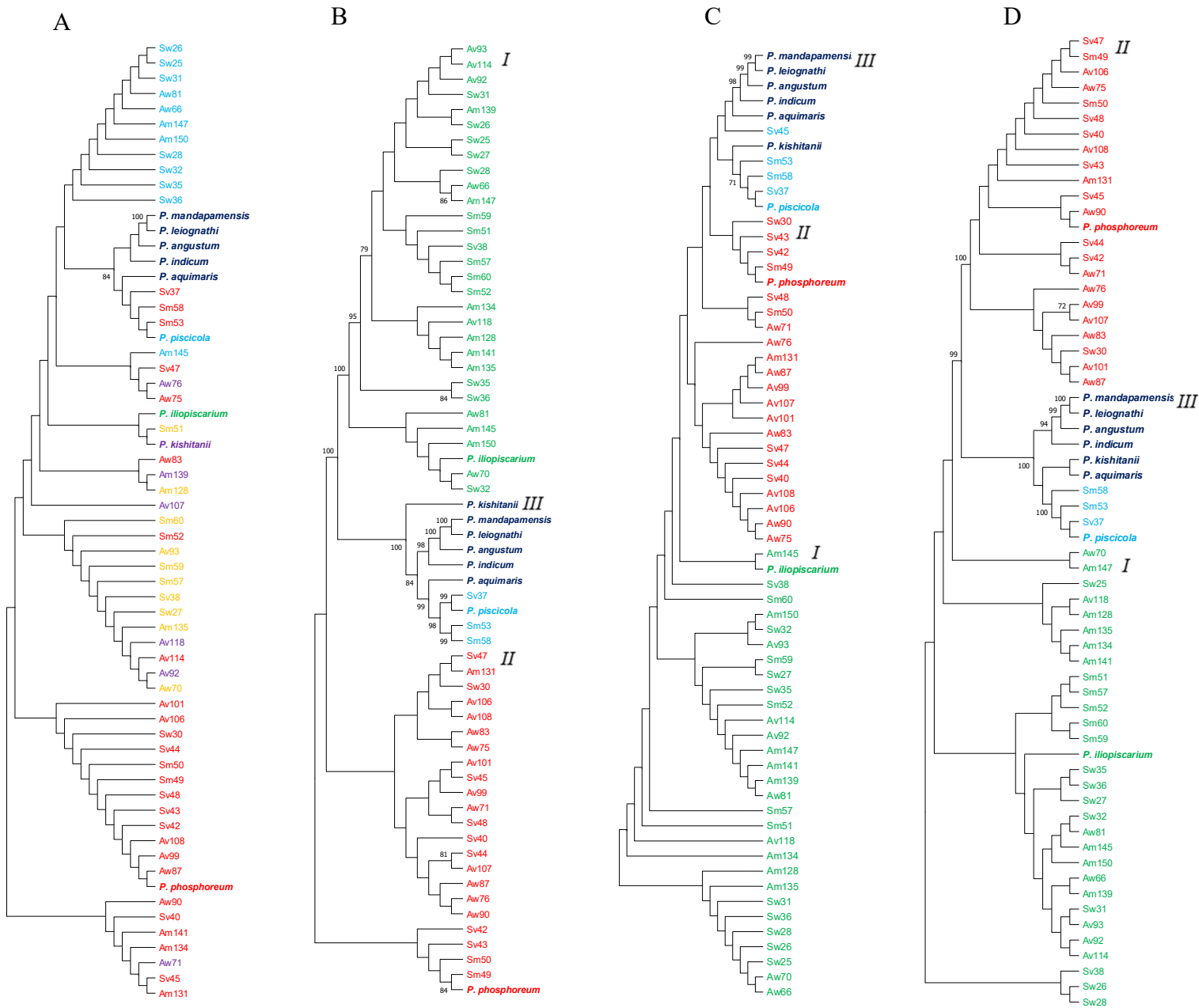
Fylogenetiske trær basert på enkeltsekvenser

Innledningsvis ble det utført fylogenetisk analyse med sekvensene fra hvert enkelt gen (figur 4 A (16S rRNA), B (*gyrB*), C (*gapA*) og D (*recA*) for å kartlegge de fylogenetiske forholdene mellom stammene basert på hvert enkelt gen. I tillegg til å sammenligne og identifiserer eventuelle forskjeller mellom stammenes gruppering i de ulike trærne.

I de fylogenetiske trærne basert på *gyrB* og *recA* gensekvensene (figur 4 B og D) vises tre hovedgrupper. Disse samsvarer med artsklassifiseringen basert på blast resultatene fra husholdningsgenene. Hovedgruppe I inkluderer 29 *P. iliopiscarium* klassifiserte stammer gruppert med *P. iliopiscarium* referanse stammen. Hovedgruppe II inkluderer 22 *P. phosphoreum* klassifiserte stammer gruppert sammen med *P. phosphoreum* referanse stammen. Hovedgruppe III inkluderer 3 *P. piscicola* klassifiserte stammer gruppert sammen med 7 referanse stammer av *P. kishitanii*, *P. aquimaris*, *P. angustum*, *P. piscicola*, *P. indicum*, *P. leiognathi* og *P. mandapamensis*. For alle de tre hovedgruppene vises høye bootstrap verdier på > 99 %.

I det fytogeniske treet basert på *gapA* gensekvensene (figur 4 C) er bootstrap verdiene hos alle hovedgruppene derimot lavere. Hovedgruppe III inkluderer fire stammer istedenfor tre, som i

figur 4 B og D. Det fylogenetiske treet basert på 16S rRNA sekvensene (figur 4 A) har mindre tydelig gruppering av stammene. Hovedgruppe III har en lavere bootstrap verdi (84 %) og det vises ingen tydelig gruppering av hovedgruppe I eller II.



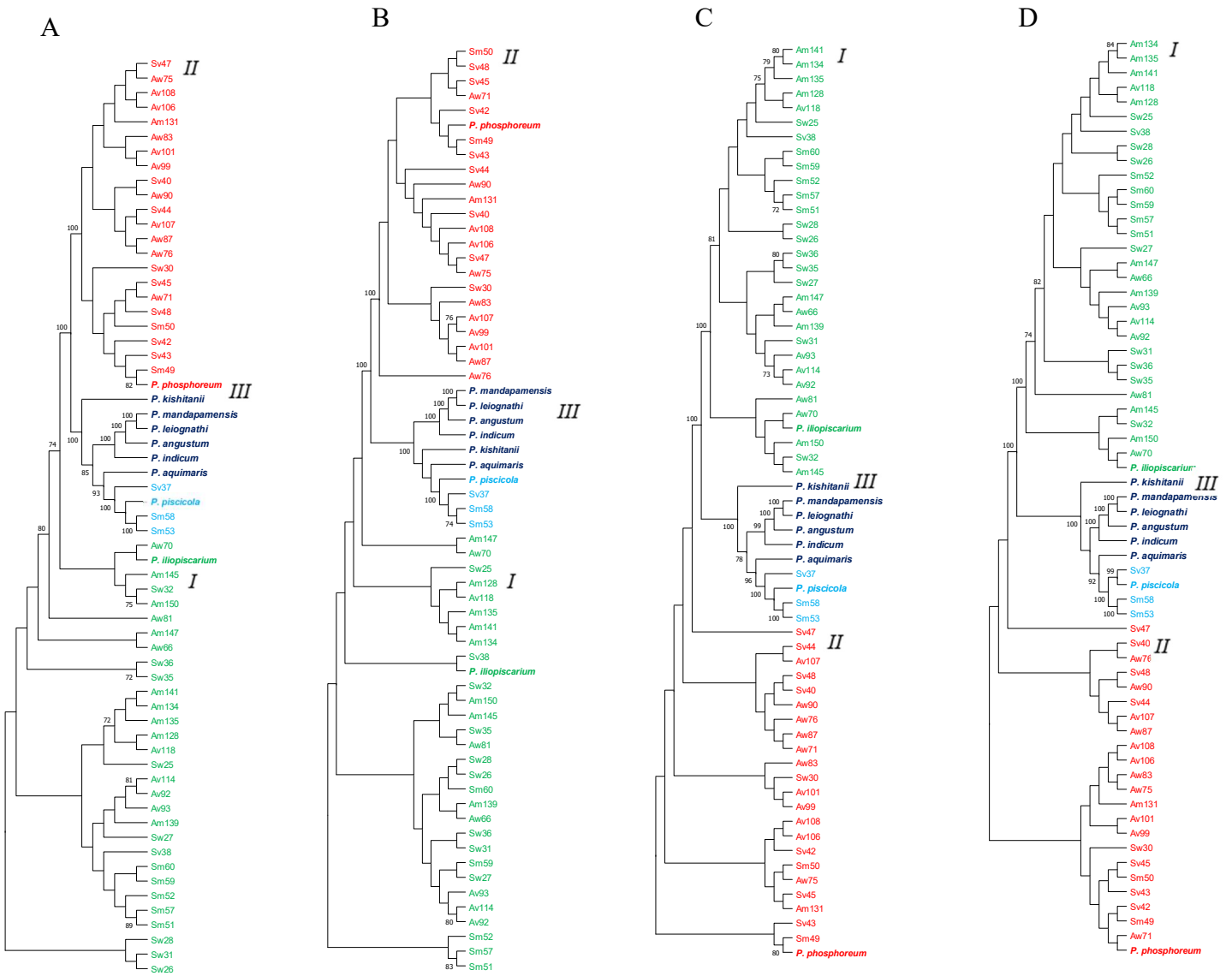
Figur 4: Neighbour-joining bootstrap trær basert på (A) 16S rRNA, (B) *gyrB*, (C) *gapA* og (D) *recA* sekvensene. Hvert tre viser forholdet blant 54 *Photobacterium* stammer. Tallene indikerer bootstrap-verdier > 70 % (prosentandel av 1000 replikasjoner). Alle trær inkluderer ni referanse stammer av *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium*, *P. kishitanii*, *P. aquimaris*, *P. angustum*, *P. piscicola*, *P. indicum*, *P. leiognathi* og *P. mandapamensis*. Stammenes farge indikerer hvilken art de ble klassifisert som basert på blast resultatene; (grønn) *P. iliopiscarium*, (rød) *P. phosphoreum*, (blå) *P. piscicola*, (gul) *P. carnosum*, (lilla) *P. kishitanii*. Romertall (I/II/III) indikerer hovedgrupper.

Fylogenetiske trær basert på sammensatte sekvenser

For å konstruere fylogenetiske trær basert på mer sekvensinformasjon ble sekvensene til 16S rRNA, *gyrB*, *gapA* og *recA* sammensatt i MEGA X. Fire sett med ulike kombinasjoner av sekvensene til 16S rRNA, *gyrB*, *gapA* og *recA* ble generert til å konstruere fire fylogenetiske trær. Disse er presentert i figur 5 A (16S rRNA, *gyrB*, *gapA* og *recA*), B (16S rRNA, *gapA* og *recA*), C (16S rRNA, *gyrB* og *recA*) og D (*gyrB*, *gapA* og *recA*).

I alle fylogenetiske trærne (figur 5 A, B, C og D) dannes tre hovedgrupper med lik sammensetning av isolerte stammer og referansestammer av *P. piscicola*, *P. iliopiscarium* og *P. phosphoreum*. Alle hovedgruppene har bootstrap verdien 100 %. I hovedgruppe III vises en undergruppe med bootstrap verdi 100 % som inkluderer de 3 *P. piscicola* klassifiserte stammene og en referanse stamme av *P. piscicola*. Innen hovedgruppe I og II dannes forskjellige undergrupper mellom alle de fylogenetiske trærne (figur 5 A, B, C, D).

Basert på avvikende identifisering på artsnivå ved sekvensering av 16S rRNA sammenlignet med de tre husholdningsgenene, blir resultatene fra husholdningsgenene brukt videre i denne oppgaven.



Figur 5: Neighbour-joining bootstrap tre basert på sammensatte sekvenser av (A) 16S rRNA, gyrB, gapA og recA (B) 16S rRNA, gapA og recA (C) 16S rRNA, gyrB og recA (D) gyrB, gapA og recA. Hvert tre viser forholdet blant 54 *Photobacterium* stammer. Tallene indikerer bootstrap-verdier > 70 % (prosentandel av 1000 replikasjoner). Alle trær inkluderer ni referanse stammer av *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium*, *P. kishitanii*, *P. aquimaris*, *P. angustum*, *P. piscicola*, *P. indicum*, *P. leiognathi* og *P. mandapamensis*. Stammenes farge indikerer artsklassifiseringen basert på blast resultatene; (grønn) *P. iliopiscarium*, (rød) *P. phosphoreum*, (blå) *P. piscicola*, (gul) *P. carnosum*, (lilla) *P. kishitanii*. Hovedgrupper er markert med romertall (I/II/III).

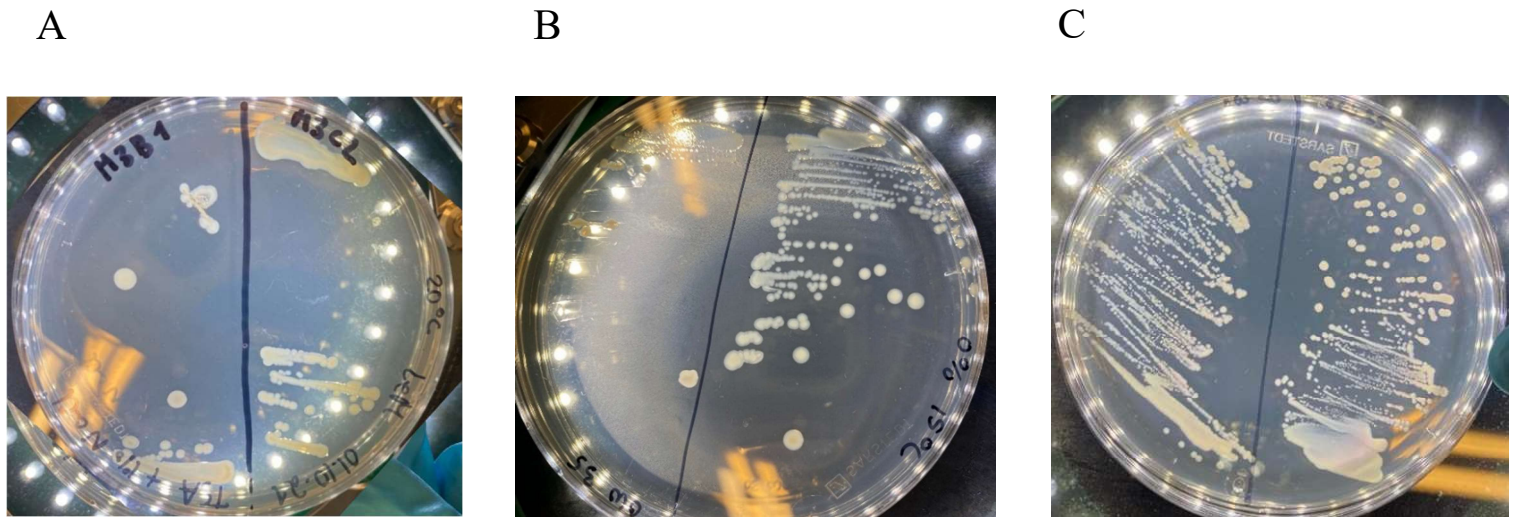
4.2 Vekst av *Photobacterium* arter ved ulike miljøfaktorer

Screening av vekst til 54 *Photobacterium* stammer ble utført ved dyrking på TSA ved ulike temperatur (4, 8, 12 og 16 °C), CO₂ konsentrasjoner (100 % ved start av inkubering) og saltkonsentrasjoner (0, 1, 3 og 6 % NaCl). Disse faktorene ble valgt ettersom det er aktuelle prosesseringsfaktorer i lett prosesserte rødspette produkter som denne oppgaven fokuserer på. Det er derfor relevant å undersøke toleransen for ulike temperaturer, saltkonsentrasjoner og CO₂ konsentrasjoner. I tillegg til analysering av eventuelle forskjeller i vekst mellom stammene angående fangstsesong (april og september) og isolasjonsatmosfære (MAP, vakuum og luft) av rødspette prøvene. Stammenes vekst etter syv dager inkubering vises i tabell 12 og er generert ved å subjektivt evaluere antall kolonier i petriskålen av hver stamme fra 0, 1, 2 eller 3 (ingen til mye vekst). Tallene indikerer dermed hvor mye av petriskålen som var dekket med kolonier; 1/3 av petriskålen 2/3 eller 3/3. Figur 6 presenterer eksempler for evaluering av seks stammer med tallene 1-3 (venstre til høyre).

Tabell 12: Stammenes vekst etter syv dager inkubert på TSA + 1 % NaCl ved 4, 8, 15 og 20 °C, på TSA + 0, 1, 3 og 6 % NaCl ved 4 og 15 °C og på TSA + 1 % NaCl med 96-100 % CO₂ ved 4 og 15 °C. «■» representerer mye vekst «■» representerer middels vekst, «■» representerer lite vekst og «□» representerer ingen vekst.

Art	Isolasjons ID	1 % NaCl				0 % NaCl		3 % NaCl		6 % NaCl		1 % NaCl + CO ₂	
		4 °C	8 °C	15 °C	20 °C	4 °C	15 °C	4 °C	15 °C	4 °C	15 °C	4 °C	15 °C
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw32	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw35	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw31	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw26	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw36	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw27	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw28	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw25	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm57	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm60	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm51	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm52	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm59	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Sv38	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Am150	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Am141	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Am139	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Am135	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	AM145	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Am134	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Am128	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Av93	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Av114	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Av92	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Av118	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Aw81	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Aw70	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. iliopiscarium</i>	Aw66	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. phosphoreum</i>	Sw30	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. phosphoreum</i>	Sm50	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. phosphoreum</i>	Sm49	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. phosphoreum</i>	Sv48	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. phosphoreum</i>	Sv47	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. phosphoreum</i>	Sv45	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
<i>P. phosphoreum</i>	Sv42	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

<i>P. phosphoreum</i>	Sv44													
<i>P. phosphoreum</i>	Sv40													
<i>P. phosphoreum</i>	Sv43													
<i>P. phosphoreum</i>	Am145													
<i>P. phosphoreum</i>	Am131													
<i>P. phosphoreum</i>	Av107													
<i>P. phosphoreum</i>	Av101													
<i>P. phosphoreum</i>	Av99													
<i>P. phosphoreum</i>	Av106													
<i>P. phosphoreum</i>	Av108													
<i>P. phosphoreum</i>	Aw76													
<i>P. phosphoreum</i>	Aw83													
<i>P. phosphoreum</i>	Aw71													
<i>P. phosphoreum</i>	Aw75													
<i>P. phosphoreum</i>	Aw87													
<i>P. phosphoreum</i>	Aw90													
<i>P. piscicola</i>	Sm53													
<i>P. piscicola</i>	Sm58													
<i>P. piscicola</i>	Sv38													



Figur 6: Evaluering fra 0-3 av vekst etter inkubering av *Photobacterium* stammer på TSA. (A) Stamme Am145 og Am150 etter 1 dag inkubering på TSA + 1 % NaCl ved 20 °C, evaluert som 1, (B), stamme Sw35 og Sw30 etter 5 dager inkubering på TSA + 0 % NaCl ved 15 °C evaluert som henholdsvis 1 og 2 og (C) stamme Sw30 og Sw35 etter 7 dager inkubering på TSA + 1 % NaCl ved 8 °C, evaluert som 3 (Bilde: eget)

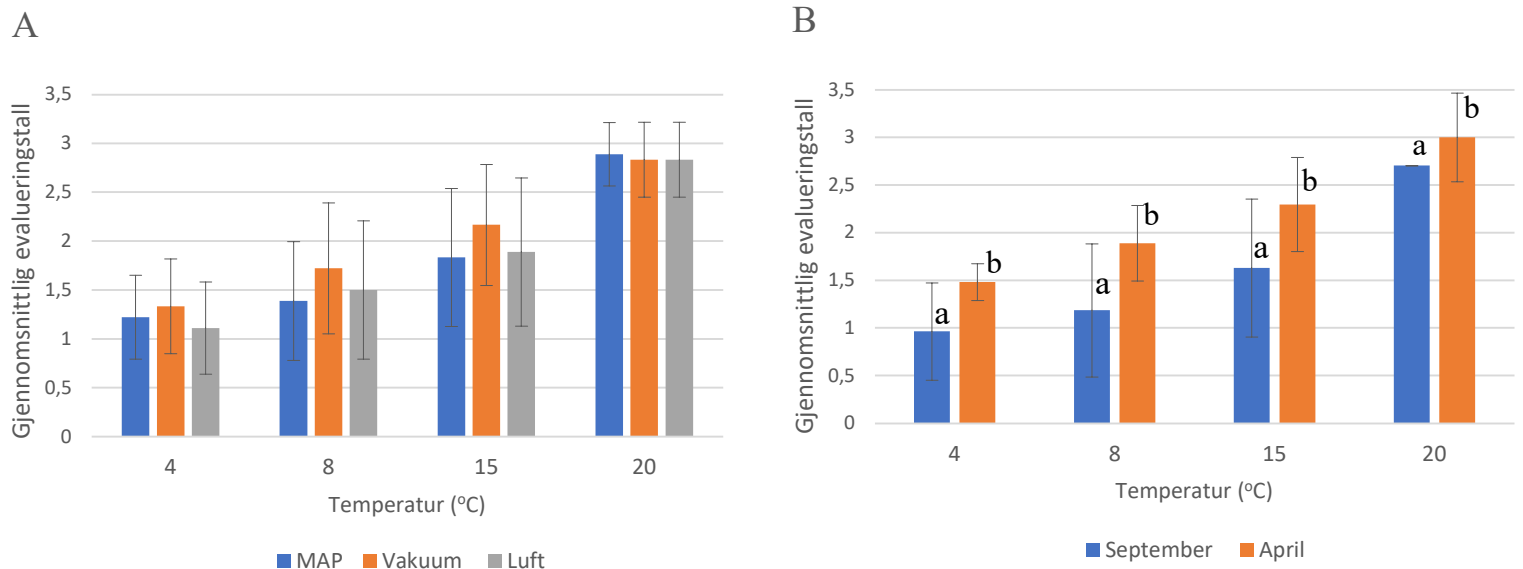
4.2.1 Temperatur

Screening av stammenes temperaturavhengige vekst viste vekst hos alle stammene på TSA med 1 % NaCl ved 4, 8, 15 og 20 °C. Ved den laveste temperaturen (4 °C) ble det observert middels vekst hos 41 av 54, mens nesten all de andre temperaturene hadde mye vekst. En økning i vekst vistes for noen stammer ved 8 °C, hvor mye vekst ble observert hos 30 av 54 stammer. Ved 15 °C ble mye vekst observert hos flertallet av stammene (41 av 54), og ved den høyeste temperaturen (20 °C) ble mye vekst observert hos alle stammene (tabell 11).

Effekt av fangstsesong og isolasjonsatmosfære på vekst ved ulike temperaturer

For å kartlegge eventuelle forskjeller i vekst knyttet til fangstsesong og isolasjonsatmosfære, ble statistiske analyser utført på resultatene fra screeningsforsøket med evalueringstallene (0, 1, 2 og 3) av stammenes vekst (tabell 11). For hver temperatur (4, 8, 15 og 20 °C) ble vekst mellom MAP-, vakuums- og luft isolerte stammer sammenlignet. Fra hver atmosfære ble henholdsvis 18 stammer isolert (n=18). Forskjeller i vekst mellom april og september isolerte stammer ble tilsvarende analysert for hver temperatur (4, 8, 15 og 20 °C). Fra hver sesong ble henholdsvis 27 stammer isolert (n=27).

Figur 7 (A) og vedlegg D viser at stammene som ble isolert fra vakuumpakkete prøver i gjennomsnitt hadde mer vekst enn stammene som ble isolert fra MAP og luft pakkete prøver ved 4, 8 og 15 °C, men uten signifikante forskjeller. Ved 20 °C ble nesten like mye vekst observert mellom stammene fra de tre atmosfærene. Figur 7 (B) og vedlegg D viser at stammene som ble isolert i april i gjennomsnitt hadde signifikant mer vekst ved alle temperaturer (4, 8, 15 og 20 °C) (uparet t-test $p < 0,05$). I noen grupper ble et relativt høyt standardavvik beregnet, opptil 0,76, noe som indikerer stor variasjon mellom stammene som ble isolert under den samme fangstsesongen og fra den samme isolasjonsatmosfæren.



Figur 7: Gjennomsnittlig evalueringstall \pm SD etter 7 dager på TSA + 1 % NaCl ved 4, 8, 15 og 20 °C for (A) stammer isolert fra MAP (n=18), vakuums (n=18) og luft (n=18) og (B) stammer isolert i april (n=27) eller september (n=27). Signifikante forskjeller er beregnet ved bruk av (A) ANOVA ($p < 0,05$) og (B) uparet t-test ($p < 0,01$). Forskjellige små bokstaver (abc) indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene (B) april og september ved 4, 8, 15 og 20 °C ($p < 0,01$).

4.2.2 Salttoleranse

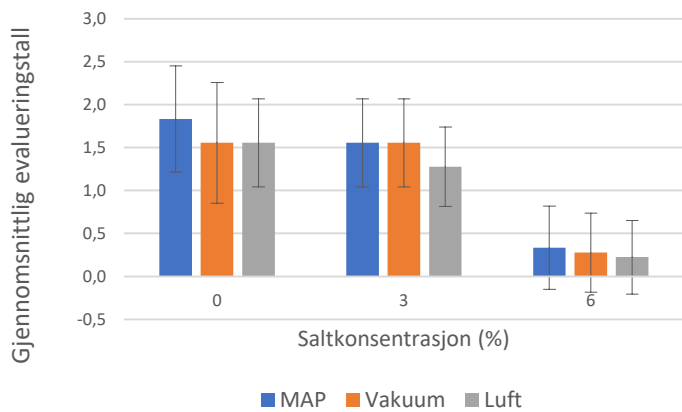
Ved screening av stammenes vekst på TSA med 0, 3 og 6 % NaCl, inkubert ved 4 og 15 °C ble det etter 7 dager observert betydelig mer vekst på 0 og 3 % enn på 6 % NaCl (tabell 11). I tillegg ble bakterieveksten mer hemmet ved 4 °C enn ved 15 °C ved alle saltkonsentrasjonene. På TSA med 0 % NaCl ble fullstendig hemmet vekst kun observert hos to stammer. Inkubering på TSA + 6 % NaCl i kombinasjon med 4 °C hadde den mest hemmende effekten. Her ble fullstendig hemmet vekst observert hos 39 stammer. Ved 15 °C hemmet 6 % NaCl veksten til 20 stammer fullstendig (tabell 11).

Effekt av fangstsesong og isolasjonsatmosfære på vekst ved ulike saltkonsentrasjoner

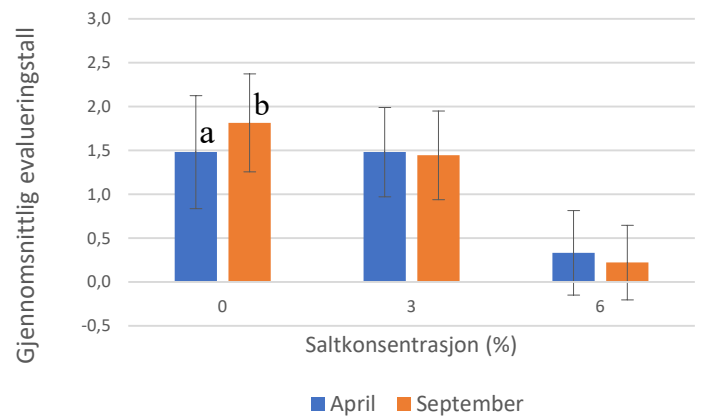
Figur 8 (A og C) og vedlegg E viser ingen signifikante forskjeller i gjennomsnittlig vekst mellom stammer fra ulike atmosfære typene (MAP, vakuum og luft). Dette gjelder både for vekst på TSA med 0, 3 og 6 % NaCl ved 4 °C (figur 8 A) og ved 15 °C (figur 8 C).

Figur 8 (B og D) og vedlegg E viser relativ lik gjennomsnittlig vekst mellom stammer isolert i april og september ved alle tre saltkonsentrasjonene og ved både 4 og 15 °C. Signifikante forskjeller vises kun ved 4 °C i kombinasjon med 0 % NaCl, hvor stammer som ble isolert i april har mer vekst enn stammer som ble isolert i september (uparet t-test, $p < 0,05$) (vedlegg E).

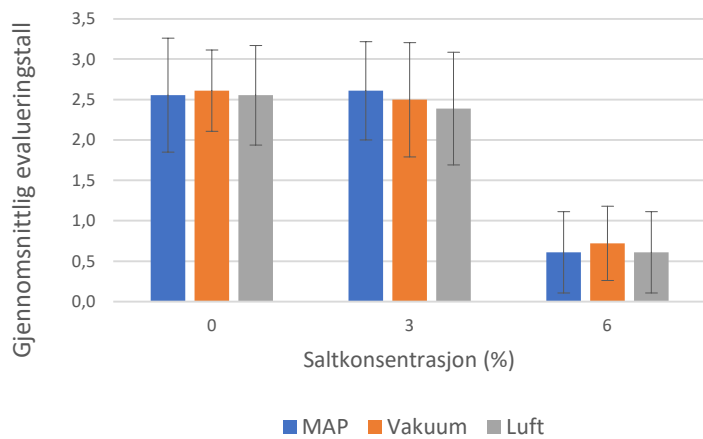
A



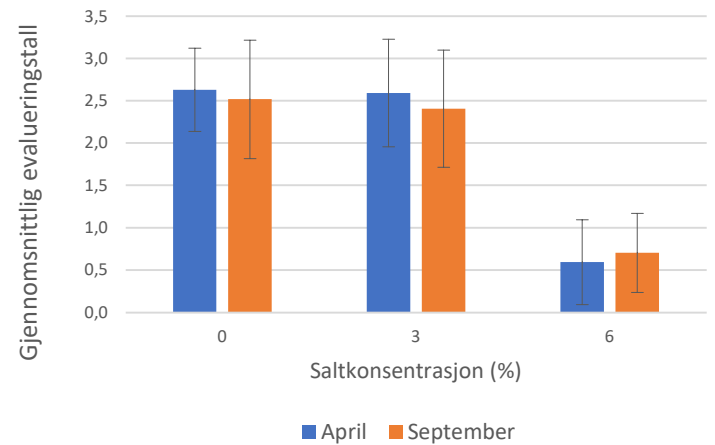
B



C



D



Figur 8: Gjennomsnittlig evalueringstall \pm SD etter 7 dager på TSA + 0, 3 og 6 % NaCl ved (A og B) 4 °C og (C og D) 15 °C for (A og C) stammer isolert fra MAP ($n=18$), vakuum ($n=18$) og luft ($n=18$) og (B og D) stammer isolert i april ($n=27$) eller september ($n=27$). Signifikante forskjeller er beregnet ved bruk av (A og C) ANOVA ($p < 0,01$) og (B og D) uparet t-test ($p < 0,05$). Forskjellige små bokstaver (abc) indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene (B) april og september ($p < 0,05$).

4.2.3 CO₂ toleranse

Ved inkubering på TSA med 1 % NaCl og 100 % CO₂ (ved start av inkubering) i 7 dager ble veksten betydelig mer hemmet ved 4 °C sammenlignet med 15 °C. Fullstendig hemmet vekst ble oppnådd hos 3 stammer ved inkubasjon med CO₂ og 4 °C. På dag 7 ble CO₂ konsentrasjonen målt til 98,6 % ved 4 °C og 96,3 % ved 15 °C.

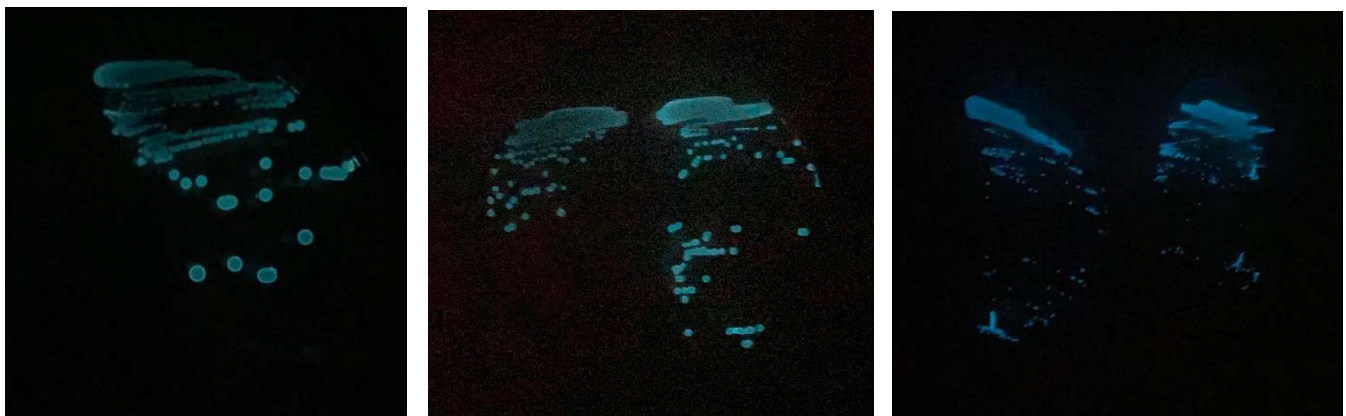
4.2.4 Bioluminescens

På L&H genererte til sammen 25 av 54 stammer bioluminescens i løpet av syv dager (tabell 13). Disse inkluderte både *P. phosphoreum* stammer (19), *P. iliopiscarium* (5) og *P. piscicola* stammer (1). Tabell 13 viser at det ble observert bioluminescens ved alle temperaturer, men at det var forskjell mellom stammene ved hvilken temperatur og etter hvilken dag de genererte bioluminescens. Etter fire dager ble det observert at de fleste stammene (23) dannet bioluminescens ved 15 °C og de færreste (10) ved 20 °C. Etter syv dager genererte de fleste stammene (16) bioluminescens ved 15 °C og færrest stammer (10) ved 4 og 8 °C. Bioluminescens intensiteten økte i løpet av de 7 dagene. Figur 9 viser eksempler av fem stammer som genererte bioluminescens.

Tabell 13: Stammenes evne å generere bioluminescens på L&H ved 4, 8, 15 og 20 °C etter 4 og 7 dager. «Blå» representerer generering av bioluminescens.

		Dag 4				Dag 7			
		4 °C	8 °C	15°C	20°C	4 °C	8 °C	15 °C	20 °C
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw32								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw35								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw31								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw26								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw36								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw27								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw28								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sw25								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm57								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm60								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm51								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm52								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sm59								
<i>P. iliopiscarium</i>	Sv38								
<i>P. iliopiscarium</i>	Am150								
<i>P. iliopiscarium</i>	Am141								
<i>P. iliopiscarium</i>	Am139								
<i>P. iliopiscarium</i>	Am135								
<i>P. iliopiscarium</i>	AM145								
<i>P. iliopiscarium</i>	Am134								
<i>P. iliopiscarium</i>	Am128								
<i>P. iliopiscarium</i>	Av93								
<i>P. iliopiscarium</i>	Av114								
<i>P. iliopiscarium</i>	Av92								
<i>P. iliopiscarium</i>	Av118								
<i>P. iliopiscarium</i>	Aw81								
<i>P. iliopiscarium</i>	Aw70								
<i>P. iliopiscarium</i>	Aw66								
<i>P. phosphoreum</i>	Sw30								
<i>P. phosphoreum</i>	Sm50								
<i>P. phosphoreum</i>	Sm49								
<i>P. phosphoreum</i>	Sv48								
<i>P. phosphoreum</i>	Sv47								
<i>P. phosphoreum</i>	Sv45								
<i>P. phosphoreum</i>	Sv42								
<i>P. phosphoreum</i>	Sv44								
<i>P. phosphoreum</i>	Sv40								

<i>P. phosphoreum</i>	Sv43							
<i>P. phosphoreum</i>	Am145							
<i>P. phosphoreum</i>	Am131							
<i>P. phosphoreum</i>	Av107							
<i>P. phosphoreum</i>	Av101							
<i>P. phosphoreum</i>	Av99							
<i>P. phosphoreum</i>	Av106							
<i>P. phosphoreum</i>	Av108							
<i>P. phosphoreum</i>	Aw76							
<i>P. phosphoreum</i>	Aw83							
<i>P. phosphoreum</i>	Aw71							
<i>P. phosphoreum</i>	Aw75							
<i>P. phosphoreum</i>	Aw87							
<i>P. phosphoreum</i>	Aw90							
<i>P. piscicola</i>	Sm53							
<i>P. piscicola</i>	Sm58							
<i>P. piscicola</i>	Sv37							



Figur 9: Bioluminescens på L&H etter 7 dager inkubering ved 20 °C. Fra venstre til høyre: Stamme Aw66, Aw83, Aw87, Av106, Av107. (Bilde: eget)

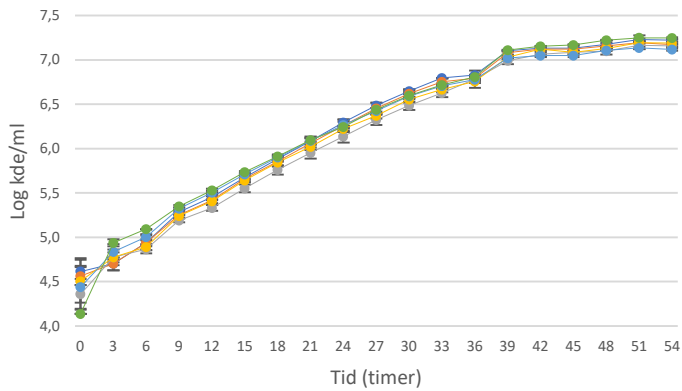
4.3 Vekstkinetikk parametere for seks *Photobacterium* stammer

Det ble utført to vekstkinetikk forsøk ved dyrking av seks *Photobacterium* stammer. To stammer av hver identifisert artsgruppe; *P. iliopiscarium* (Am135 og Aw66), *P. phosphoreum* (Sw30 og Av108) og *P. piscicola* (Om58 og Sv37) ble valgt for å kartlegge eventuelle artsbaserte forskjeller i vekstkinetikk parametere.

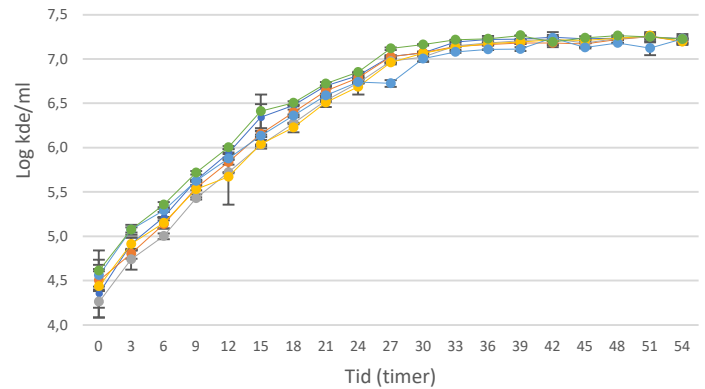
4.3.1 Temperaturavhengige vekstkinetikk parametere

I dette forsøket ble alle seks *Photobacterium* stammene dyrket på TSA med 1 % NaCl ved 4, 8, 12 og 16 °C over en periode på 54 timer. Figur 10 viser at alle stammene var i stand til å vokse ved 4-16 °C og at det var en relativ lik vekstutvikling mellom stammene ved alle temperaturer.

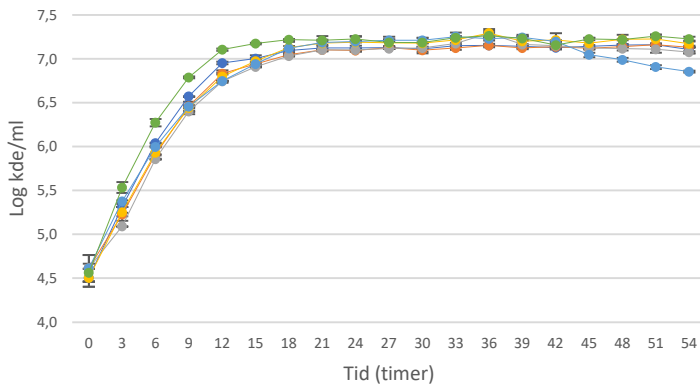
A



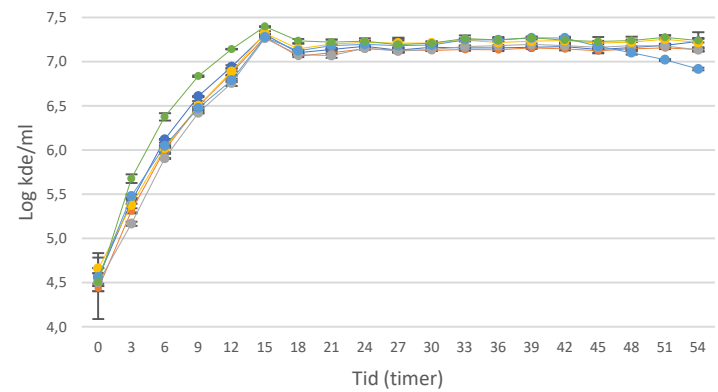
B



C



D



—●— Am135 —●— Av108 —●— Aw66 —●— Om58 —●— Sv37 —●— Sw30

Figur 10: Vekstutviklingen av seks utvalgte *Photobacterium* stammer ved (A) 4 °C, (B) 8 °C, (C) 12 °C og (D) 16 °C. Endring i vekst vises som log-transformerte kimtall \pm SD (vertikale stolper) over en tidsperiode på 54 timer. For alle prøvepunktene er $n=3$. Relativ standardavvik ble beregnet på $<8\%$ mellom alle parallellene ($n=3$), for alle målinger og temperaturer.

En oversikt over vekstkinetikk parametere og signifikante forskjeller mellom stammenes vekst ved ulike temperaturer (4, 8, 12 og 16 °C) vises i tabell 14. Alle signifikante forskjeller ble beregnet ved bruk av enveis ANOVA, $p < 0,05$, Tukey's-b. Det ble ikke observert lagfase (Y_{start}) for noen av stammene unntatt *P. iliopiscarium* Aw66 ved 4 og 8 °C ($p < 0,01$). Hos alle stammene var startkonsentrasjonen relativ lik, mellom 4,32 og 4,77 kde/ml. Kun ved 8 °C hadde *P. piscicola* Sv37 en signifikant høyere startkonsentrasjon enn *P. iliopiscarium* Am135 ($p < 0,01$).

For alle stammene vistest en signifikant raskere veksthastighet (μ_{maks}) ved de to høyeste temperaturene (12 og 16 °C) sammenlignet med inkubering ved de to laveste temperaturene (4 og 8 °C) ($p < 0,01$). Alle stammene nådde den stasjonære vekstfasen dermed ca. innen 1/3 av tiden med 12 og 16 °C (ca. etter 15 timer) enn ved 4 °C (ca. etter 48 timer). Ved 8 °C ble den nådd ca. 2/3 tidligere (ca. etter 33 timer) enn ved 4 °C for alle stammene. Signifikante forskjeller i veksthastigheten mellom de laveste temperaturene (4 og 8 °C) ble kun observert for *P. iliopiscarium* Am135 og *P. phosphoreum* Aw30 ($p < 0,01$). Mellom 12 og 16 °C ble signifikant raskere vekst kun observert for *P. piscicola* Sv37 med raskest vekst ved 16 °C. Videre hadde *P. iliopiscarium* Aw66 raskest vekst ved 12 °C, men uten signifikant forskjell.

Ved 4 °C var veksthastigheten (μ_{maks}) relativt lik mellom alle stammene (0,067-0,071 time^{-1}) og det vistest ingen signifikante forskjeller. Forskjeller i veksthastigheten mellom stammene vistest derimot ved 8 °C hvor *P. iliopiscarium* Am135 vokste signifikant raskere enn *P. iliopiscarium* Aw66 og *P. piscicola* Sm58 ($p < 0,001$). Derimot vokste *P. piscicola* Sm58 signifikant raskere enn alle de andre stammene ved de høyeste temperaturene, både ved 12 °C ($p < 0,001$) og 16 °C ($p < 0,01$).

Videre hadde denne stammen (*P. piscicola* Sm58) også en signifikant høyere sluttkonsentrasjon i både 8 °C ($p < 0,001$), 12 og 16 °C ($p < 0,01$) sammenlignet med alle de andre stammene. Både *P. piscicola* Sm58 og *P. iliopiscarium* Aw66 hadde en signifikant høyere sluttkonsentrasjon ved 4 °C ($p < 0,01$) sammenlignet med resten av stammene. *P. piscicola* Sv37 hadde signifikant lavest sluttverdi av alle stammene ved 4 og 8 °C ($p < 0,01$).

Alle stammene nådde en relativ lik sluttkonsentrasjon (Y_{maks}) (7,094-7,238 log kde/ml), uavhengig av temperatur. Noen signifikante forskjeller vistest ved at *P. iliopiscarium* Am135 og Aw66, og *P. phosphoreum* Av108 nådde høyere sluttkonsentrasjoner ved lave temperaturer (4 og 8 °C). Videre nådde *P. piscicola* Sv37 en høyere sluttkonsentrasjon ved 16 °C enn ved alle de andre temperaturene.

Tabell 14: Vekstkinetikk parametere for alle seks stammer i forskjellige inkubasjonstemperaturer (4, 8, 12, 16 °C) med 1 % NaCl, estimert fra den primære modellen til Baranyi og Roberts (1994). Hver prøve punkt er representert som gjennomsnitt ($n=3 \pm SE$). Tabellen viser maksimal veksthastighet (μ_{maks} , $time^{-1}$), lagfase (timer), maksimal bakterievekst (Y_{maks} log kde/g, R^2 (hvor bra modellen passer til datasettet), SE (standardfeil til R^2).¹

Stamme	Temperatur	Lag-fase (timer)	μ_{maks} ($time^{-1}$)	Y_{start} (log kde/ml)	Y_{maks} (log kde/ml)	R^2	SE
Am135 <i>P. iliopiscarium</i>	4 °C	NL ^{I a}	0,068 ± 0,002 ^{I a}	4,38 ± 0,038 ^{I a}	7,150 ± 0,037 ^{I/II ab}	0,994	0,070
	8 °C	NL ^{I a}	0,105 ± 0,003 ^{III b}	4,60 ± 0,044 ^{I a}	7,199 ± 0,025 ^{I/II b}	0,995	0,070
	12 °C	NL ^{I a}	0,193 ± 0,009 ^{I c}	4,56 ± 0,059 ^{I a}	7,114 ± 0,020 ^{I a}	0,990	0,074
	16 °C	NL ^{I a}	0,207 ± 0,009 ^{I c}	4,57 ± 0,058 ^{I a}	7,155 ± 0,020 ^{I/II ab}	0,991	0,072
	p-verdi	-	p<0,01	p<0,01	p<0,001		
Aw66 <i>P. iliopiscarium</i>	4 °C	0,4 ± 0,6 ^{I a}	0,071 ± 0,002 ^{I a}	4,58 ± 0,045 ^{I a}	7,191 ± 0,033 ^{II b}	0,995	0,066
	8 °C	0,4 ± 0,6 ^{I a}	0,071 ± 0,002 ^{I a}	4,58 ± 0,045 ^{I/II a}	7,191 ± 0,033 ^{I/II b}	0,995	0,066
	12 °C	NL ^{I a}	0,233 ± 0,008 ^{I/II b}	4,76 ± 0,045 ^{I a}	7,120 ± 0,014 ^{I a}	0,995	0,054
	16 °C	NL ^{I a}	0,200 ± 0,017 ^{I b}	4,58 ± 0,103 ^{I a}	7,165 ± 0,034 ^{I/II ab}	0,970	0,125
	p-verdi	p<0,01	p<0,01	p<0,01	p<0,01		
Sw30 <i>P. phosphoreum</i>	4 °C	NL ^{I a}	0,067 ± 0,002 ^{I a}	4,56 ± 0,037 ^{I a}	7,173 ± 0,036 ^{I/II a}	0,994	0,067
	8 °C	NL ^{I a}	0,095 ± 0,004 ^{I/II/III b}	4,54 ± 0,055 ^{I/II a}	7,207 ± 0,033 ^{I/II a}	0,990	0,090
	12 °C	NL ^{I a}	0,201 ± 0,010 ^{I/II c}	4,77 ± 0,062 ^{I a}	7,176 ± 0,021 ^{I/II a}	0,990	0,077
	16 °C	NL ^{I a}	0,202 ± 0,009 ^{I c}	4,60 ± 0,055 ^{I a}	7,219 ± 0,018 ^{II/III a}	0,992	0,067
	p-verdi	-	p<0,01	p<0,01	p<0,05		
Av108 <i>P. phosphoreum</i>	4 °C	NL ^{I a}	0,070 ± 0,002 ^{I a}	4,55 ± 0,030 ^{I a}	7,170 ± 0,027 ^{I/II c}	0,996	0,054
	8 °C	NL ^{I a}	0,103 ± 0,003 ^{II/III a}	4,62 ± 0,039 ^{I/II a}	7,179 ± 0,021 ^{I/II c}	0,995	0,061
	12 °C	NL ^{I a}	0,201 ± 0,008 ^{I/II b}	4,32 ± 0,046 ^{I a}	7,109 ± 0,015 ^{I a}	0,994	0,057
	16 °C	NL ^{I a}	0,239 ± 0,014 ^{I/II b}	4,58 ± 0,075 ^{I a}	7,134 ± 0,024 ^{I b}	0,987	0,089
	p-verdi	-	p<0,01	p<0,01	p<0,001		
Sm58 <i>P. piscicola</i>	4 °C	NL ^{I a}	0,069 ± 0,004 ^{I a}	4,60 ± 0,078 ^{I a}	7,226 ± 0,073 ^{II a}	0,976	0,142
	8 °C	NL ^{I a}	0,069 ± 0,004 ^{I a}	4,62 ± 0,078 ^{I/II a}	7,226 ± 0,073 ^{II a}	0,976	0,142
	12 °C	NL ^{I a}	0,259 ± 0,011 ^{II b}	4,66 ± 0,052 ^{I a}	7,209 ± 0,016 ^{II a}	0,993	0,060
	16 °C	NL ^{I a}	0,280 ± 0,018 ^{II b}	4,54 ± 0,081 ^{I a}	7,238 ± 0,024 ^{III a}	0,983	0,092
	p-verdi	-	p<0,01	p<0,01	p<0,05		
Sv37 <i>P. piscicola</i>	4 °C	NL ^{I a}	0,069 ± 0,003 ^{I a}	4,76 ± 0,047 ^{I a}	7,094 ± 0,039 ^{I a}	0,685	0,389
	8 °C	NL ^{I a}	0,082 ± 0,003 ^{I/II/III a}	4,67 ± 0,046 ^{II a}	7,125 ± 0,030 ^{I ab}	0,991	0,077
	12 °C	NL ^{I a}	0,190 ± 0,017 ^{I b}	4,69 ± 0,109 ^{I a}	7,127 ± 0,037 ^{I/II ab}	0,965	0,135
	16 °C	NL ^{I a}	0,229 ± 0,012 ^{I/II c}	4,65 ± 0,063 ^{I a}	7,161 ± 0,020 ^{I/II c}	0,989	0,075
	p-verdi	-	p<0,01	p<0,01	p<0,05		
p-verdi	4 °C	p<0,01	p<0,001	p<0,01	p<0,001		
	8 °C	p<0,01	p<0,001	p<0,01	p<0,001		
	12 °C	-	p<0,001	p<0,01	p<0,01		
	16 °C	-	p<0,01	p<0,01	p<0,01		

¹ Enveis ANOVA og Tukey's-b ble brukt til å finne signifikante forskjeller på stamme- og temperaturnivå. Små bokstaver (^{abc}) viser signifikante forskjeller mellom temperaturene for samme stamme med tilhørende p-verdi rett under i samme boks. Romertall (^{I/II/III}) viser signifikante forskjeller mellom stammene ved en gitt temperatur. For hver temperatur er p-verdien angitt i nederste boks i tabellen. NL = ingen lagfase.

Sekundær vekstmodell

En sekundær vekstmodell ble brukt for å uttrykke maksimal veksthastighet (μ_{maks}) som funksjon av inkuberingstemperaturene (4, 8 og 12 og 16 °C) for alle de seks *Photobacterium* stammene. Parameterne til den sekundære vekstmodellen vises i tabell 15.

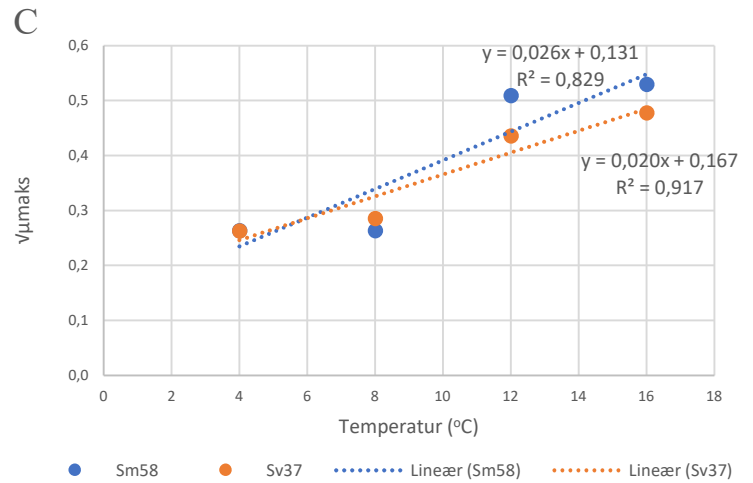
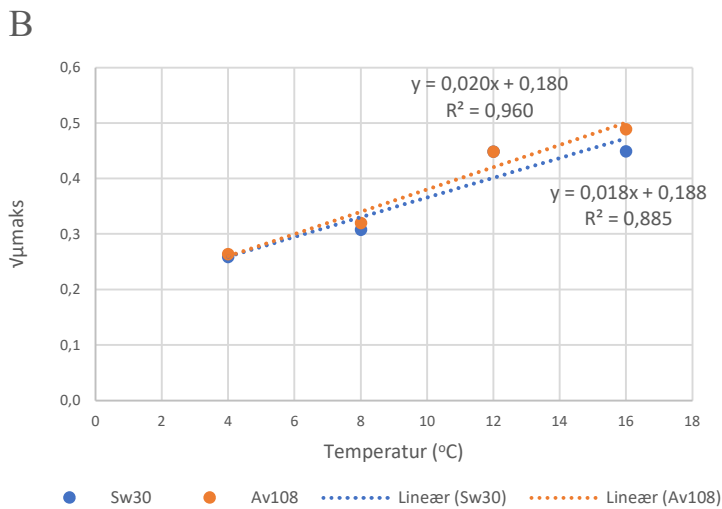
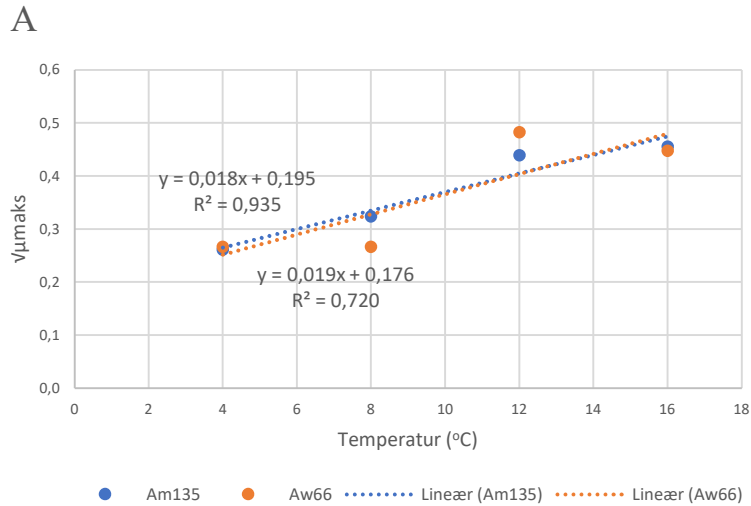
Tabell 15: Parameter til kvadratrotmodellen for effekten av temperatur på maksimal veksthastighet for de seks *Photobacterium* stammene i TSB ($n=3$). Hvor b er stigningen til regresjonslinjen, T_{min} er den teoretiske minimumstemperaturen for vekst og R^2 er hvor bra datasettet passer til modellen. Standardavvik er angitt for b og T_{min} .²

Isolasjons ID	Artsnavn	b	T_{min} (°C)	R^2
Am135	<i>P. iliopiscarium</i>	0,018 ± 0,001 ^a	-11,16 ± 1,0 ^a	0,93
Aw66	<i>P. iliopiscarium</i>	0,019 ± 0,001 ^a	-9,25 ± 1,1 ^{ab}	0,71
Sw30	<i>P. phosphoreum</i>	0,018 ± 0,001 ^a	-10,57 ± 1,7 ^{ab}	0,89
Av108	<i>P. phosphoreum</i>	0,020 ± 0,003 ^a	-8,94 ± 2,7 ^{ab}	0,96
Sm58	<i>P. piscicola</i>	0,026 ± 0,001 ^b	-5,00 ± 0,4 ^b	0,83
Sv37	<i>P. piscicola</i>	0,020 ± 0,002 ^a	-8,38 ± 2,0 ^{ab}	0,92
p-verdi		p<0,01	p<0,01	

De teoretisk estimerte minimumstemperaturene for vekst ligger mellom -5,0 og -11,16 °C. *P. piscicola* Sm58 har signifikant høyere stigningstall ($b = 0,026$) enn resten av stammene og dermed høyest respons på økt temperatur ($p < 0,01$). Like stigningstall ($b = 0,018$) vistes for stammene *P. iliopiscarium* Am135 og *P. phosphoreum* Sw30 og indikerer lignende respons på økt temperatur. Disse stammene hadde også lavest stigningstall, men uten signifikante forskjeller. Lavere stigningstall indikerer mindre respons på økt temperatur. *P. phosphoreum* Av108 og *P. piscicola* Sv37 har også like stigningstall, noe som indikerer lik respons på økt temperatur for disse stammene, men uten signifikante forskjeller.

Figur 11 indikerer også relativ lik veksthastighet mellom 12 og 16 °C for *P. iliopiscarium* Am135 og *P. piscicola* Sm58, og at *P. iliopiscarium* Aw66 har høyere veksthastighet ved 12 °C enn ved 16 °C. For *P. iliopiscarium* Aw66 og *P. piscicola* Sm58 vises det i tillegg relativ lik veksthastighet mellom 4 og 8 °C.

² Statistiske forskjeller for b og T_{min} er beregnet med ANOVA Tukey's-b ($p < 0,01$) og er angitt med små bokstaver (^{abc}).



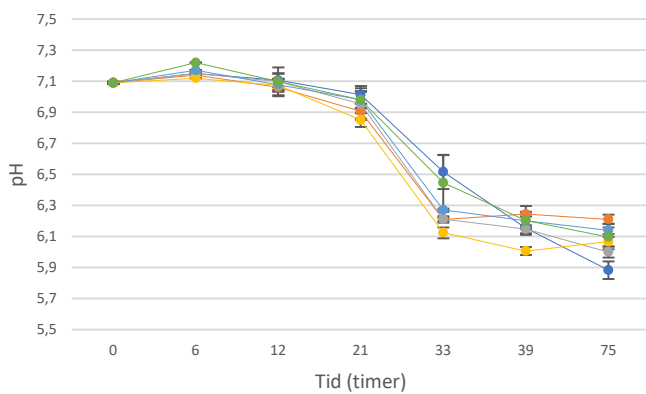
Figur 11: Maksimal veksthastighet (μ_{maks}) som funksjon av inkubasjonstemperatur (4, 8, 12 og 15 °C) i TSB-medie for seks utvalgte Photobacterium stammer. Graf (A) viser *P. iliopiscarium* Am135 og Aw66, graf (B) viser *P. phosphoreum* Sw30 og Av108, og graf (C) *P. piscicola* Sv37 og Sm58. X-aksen viser temperatur og y-aksen kvadratrotten av μ_{maks} .

Endring i pH

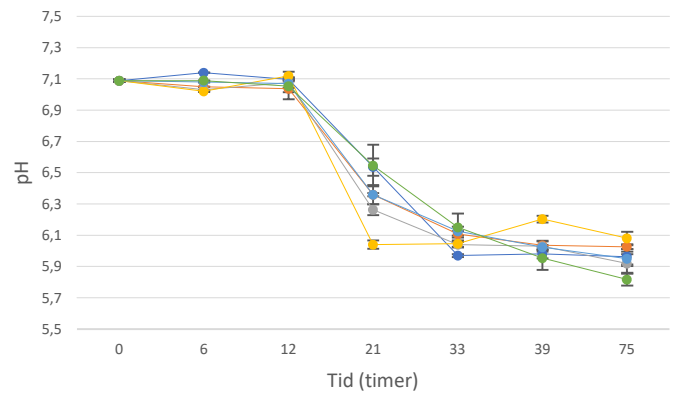
I løpet av vekstkinetikk forsøket ble pH-en målt ved syv OD-målepunkter i løpet av 75 timer for de seks utvalgte stammene og ved alle temperaturene (4, 8, 12 og 16 °C). Ved 4 og 8 °C vistes en signifikant negativ korrelasjon mellom nedgang i pH og bakterievekst hos alle stammene (Pearson korrelasjon, $p < 0,01$, $r \leq -0,944$) (figur 12). Ved 12 og 16 °C hadde alle stammene svakere og ingen signifikant negativ korrelasjon mellom nedgang i pH og vekst.

Alle stammene hadde sterkest korrelasjon ved 8 °C (Pearson korrelasjon, $p < 0,01$, $r \leq -0,944$). Ved 4 °C hadde stammene *P. phosphoreum* Sw30, *P. iliopiscarium* Am135 og *P. piscicola* Sv37 signifikant negativ korrelasjon (Pearson korrelasjon, $p < 0,001$, $r \leq -0,821$). De tre andre stammene hadde lavere, men også signifikant korrelasjon (Pearson korrelasjon, $p < 0,001$, $r \leq -0,794$). Ved den første pH målingen (etter 0 timer) ble en pH på 7,09 observert hos alle stammene. Den laveste slutt pH-en nådde *P. iliopiscarium* Sw30 i 8 °C (pH=5,82), men uten signifikante forskjeller. Den minste nedgangen i pH hadde stammen *P. piscicola* Sv37 i 16 °C (pH=6,22).

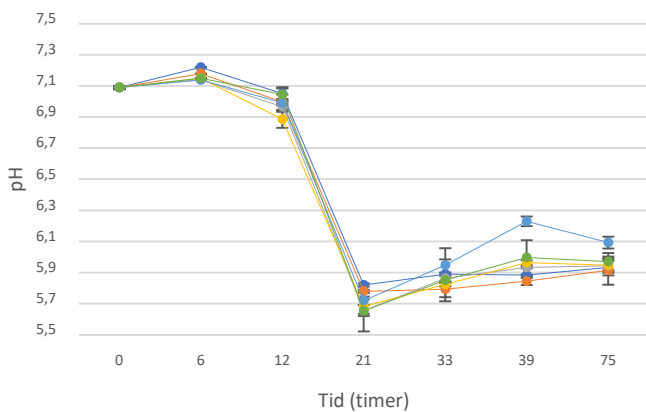
A



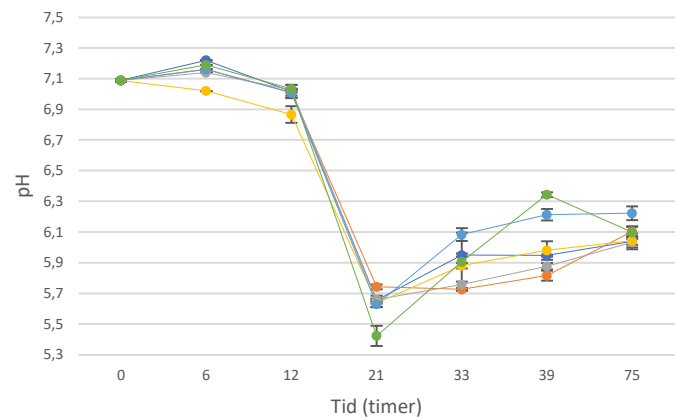
B



C



D

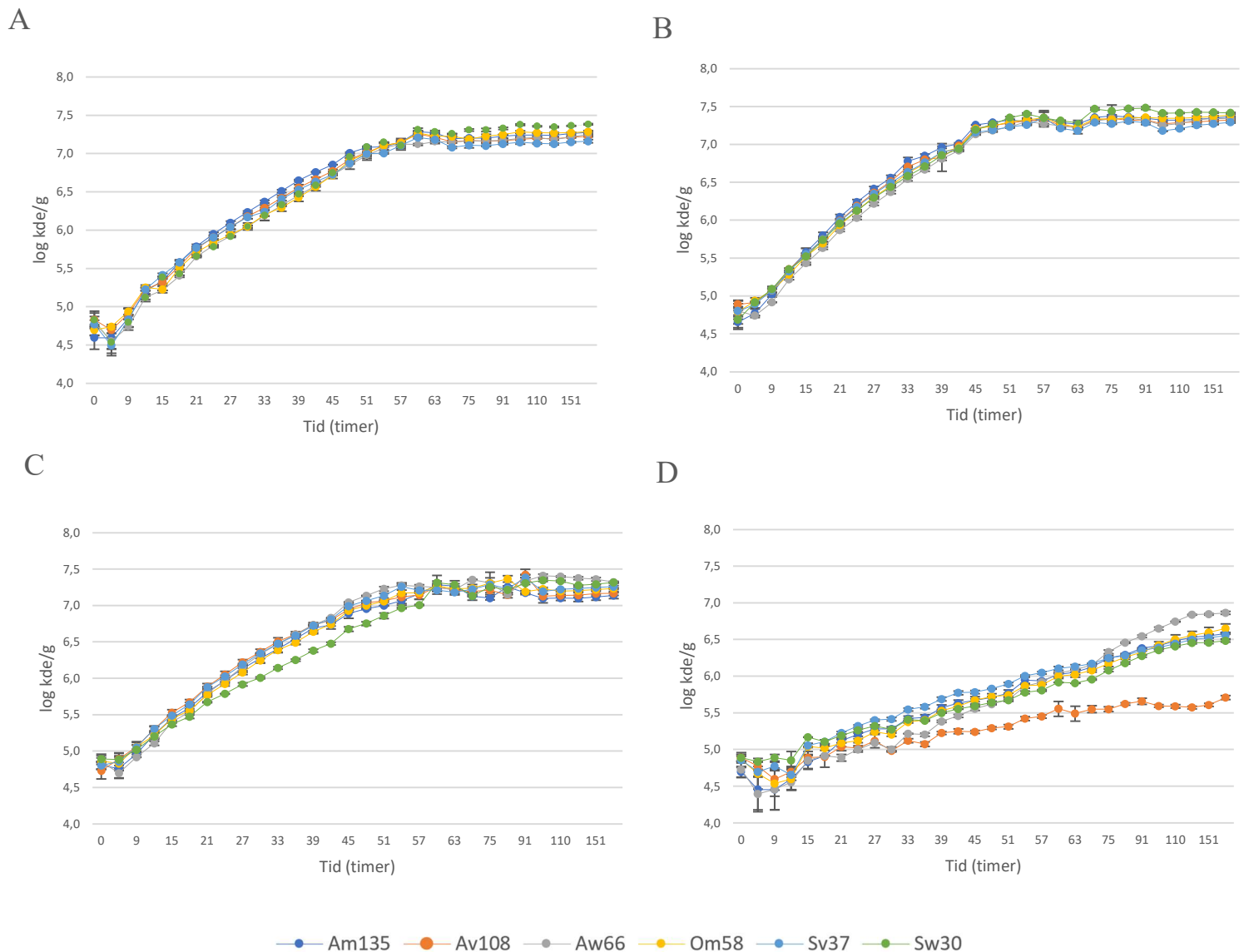


—●— Am135 —●— Av108 —●— Aw66 —●— Om58 —●— Sv37 —●— Sw30

Figur 12: pH-ending over tid for stammene Aw66, Av108, Am135, Sw30, Sv37 og Sm58 dyrket ved (A) 4, (B) 8, (C) 12 og (D) 16 °C. For alle målepunktene er $n=3$ og et feilfelt representerer \pm SD. Det er beregnet et relativ standardavvik på $<3,5\%$.

4.3.2 Saltkonsentrasjonsavhengige vekstkinetikk parametere

I dette vekstkinetikk forsøket ble alle de seks stammene inkubert i TSB + 0, 1, 3 og 6 % NaCl ved 4 °C over en perioder på 175 timer. Figur 13 viser at alle stammene hadde evnen til å vokse i alle saltkonsentrasjonene (0-6 % NaCl) i kombinasjon med lave temperaturer (4 °C). Mellom stammene vises relativ lik vekstutvikling i både 0, 1 og 3 % NaCl. I 6 % NaCl vises mer hemmet vekst hos alle stammene.



Figur 13: Vekstutviklingen av seks utvalgte *Photobacterium* stammer ved 4 °C i TSB med (A) 0 %, (B) 1 %, (C) 3 % og (D) 6 % NaCl. Endring i vekst vises som log-transformerte kintall \pm SD (vertikale stolper) over en tidsperiode på 175 timer. For alle prøvepunktene er $n=3$ og et feilfelt representerer \pm SD. Relativ standardavvik ble beregnet på < 4 %.

Tabell 16 viser en oversikt over vekstkinetikk parametere og signifikante forskjeller mellom stammenes vekst i saltkonsentrasjonene (0, 1, 3 og 6 % NaCl) ved 4 °C. Signifikante forskjeller er beregnet ved bruk av enveis ANOVA, $p < 0,05$, Tukey's-b).

Alle stammene hadde en relativ lik start konsentrasjon (4,48-4,82 log kde/ml) uten signifikante forskjeller. For fire stammer (*P. piscicola* Sm58, *P. iliopiscarium* Am135, *P. phosphoreum* Sw30 og Av108) ble lagfaser observert i nesten alle saltkonsentrasjonene. De to andre stammene *P. iliopiscarium* Aw66 og *P. piscicola* Sv37 hadde kun lagfaser i den høyeste saltkonsentrasjonen (6 % NaCl).

Ved inkubering i 6 % NaCl hadde alle stammene utenom *P. iliopiscarium* Am135 signifikant lavere veksthastighet ($p < 0,001$) enn i 0, 1 og 3 % NaCl. Forskjeller i veksthastigheten mellom de tre laveste saltkonsentrasjonene (0, 1 og 3 % NaCl) vistes for fire stammer. Her hadde *P. phosphoreum* Sw30 og Av108 samt *P. piscicola* Sv37 en signifikant høyere veksthastighet i 1 % enn i 0 og 3 % NaCl ($p < 0,001$). Videre hadde *P. piscicola* Sm58 en signifikant høyere veksthastighet i både 1 og 0 % enn i 3 % NaCl ($p < 0,001$).

Mellom stammene vistes signifikante forskjeller i veksthastighet ved inkubering i 0, 1 og 3 % NaCl, men ikke i 6 % NaCl. I både 0 og 1 % saltkonsentrasjon hadde *P. iliopiscarium* Aw66 signifikant høyere veksthastighet enn alle de andre stammene ($p < 0,001$), mens *P. iliopiscarium* Am135 hadde signifikant høyest veksthastighet av alle stammene i 3 % NaCl ($p < 0,01$). I TSB uten salt (0 % NaCl) hadde *P. phosphoreum* Sw30 signifikant lavere veksthastighet enn alle de andre stammene, mens både *P. phosphoreum* Sw30 og *P. piscicola* Sm58 hadde signifikant lavere veksthastigheter enn de andre stammene i 1 % NaCl. *P. piscicola* Sm58 hadde i tillegg lavest signifikant veksthastighet i 3 % NaCl ($p < 0,01$).

Alle stammene nådde de høyeste sluttkonsentrasjonene (7,26-7,45 log kde/ml) i 1 % NaCl, med signifikante forskjeller for to av stammene (*P. iliopiscarium* Aw66 og *P. phosphoreum* Av108) ($p < 0,001$). I den høyeste saltkonsentrasjonen (6 % NaCl) hadde alle stammene unntatt *P. iliopiscarium* Am135 signifikant lavere sluttkonsentrasjoner (6,44-6,79 kde/g) enn i de tre saltkonsentrasjonene. Mellom stammene vistes signifikante forskjeller i sluttkonsentrasjonen i alle saltkonsentrasjonene (0-6 % NaCl). *P. phosphoreum* Av108 ble betraktelig hemmet i 6 % NaCl ($p < 0,001$). Av alle stammene nådde *P. iliopiscarium* Am135 de høyeste sluttkonsentrasjonene i 3 og 6 % NaCl ($p < 0,001$), mens *P. piscicola* Sm58 nådde den høyeste sluttkonsentrasjon i 0 og 1 % NaCl ($p < 0,01$).

Tabell 16: Vekstkinetikk parametere for seks utvalgte *Photobacterium* stammer i forskjellige saltkonsentrasjoner (0, 1, 3, 6 % NaCl) ved 4 °C, estimert fra den primære modellen til Baranyi og Roberts (1994). Hvert prøvепunkt er representert som gjennomsnitt ($n=3 \pm SE$). Tabellen viser maksimal veksthastighet (μ_{maks} , $time^{-1}$), lagfase (timer), maksimal bakterievekst (Y_{maks} log kde/g), R^2 (hvor bra modellen passer til datasettet), SE (standardfeil til R^2). 3

Stamme	Saltkonsentrasjon	Lag-fase (timer)	μ_{maks} , ($time^{-1}$)	Y_{start} (log kde/ml)	Y_{maks} (log kde/ml)	R^2	SE
<i>P. iliopiscarium</i> Am135	0 %	$3,7 \pm 3,2$ ^{I a}	$0,054 \pm 0,001$ ^{I/II a}	$4,59 \pm 0,15$ ^{I a}	$7,19 \pm 0,01$ ^{II a}	0,99	0,09
	1 %	$2,6 \pm 2,3$ ^{I a}	$0,062 \pm 0,004$ ^{I/II a}	$4,67 \pm 0,05$ ^{I/II a}	$7,32 \pm 0,01$ ^{II a}	1,00	0,06
	3 %	$3,6 \pm 3,1$ ^{I a}	$0,061 \pm 0,003$ ^{III a}	$4,73 \pm 0,03$ ^{I a}	$7,35 \pm 0,02$ ^{IV a}	0,99	0,07
	6 %	$2,5 \pm 4,3$ ^{I/II a}	$0,043 \pm 0,013$ ^{II a}	$4,54 \pm 0,14$ ^{I/II a}	$7,06 \pm 0,23$ ^{III a}	0,97	0,13
	p-verdi	p<0,05	p<0,001	p<0,01	p<0,001		
<i>P. iliopiscarium</i> Aw66	0 %	NL ^{I a}	$0,058 \pm 0,005$ ^{II b}	$4,48 \pm 0,13$ ^{I a}	$7,26 \pm 0,01$ ^{II c}	1,00	0,06
	1 %	NL ^{I a}	$0,068 \pm 0,002$ ^{II b}	$4,54 \pm 0,03$ ^{I a}	$7,36 \pm 0,00$ ^{II/III d}	1,00	0,06
	3 %	NL ^{I a}	$0,054 \pm 0,002$ ^{II b}	$4,65 \pm 0,03$ ^{I a}	$7,23 \pm 0,01$ ^{I b}	0,99	0,08
	6 %	$1,2 \pm 1,3$ ^{I a}	$0,027 \pm 0,004$ ^{II a}	$4,57 \pm 0,01$ ^{I a}	$6,52 \pm 0,01$ ^{II a}	0,95	0,17
	p-verdi	p<0,05	p<0,001	p<0,01	p<0,001		
<i>P. phosphoreum</i> Sw30	0 %	$0,8 \pm 1,3$ ^{I a}	$0,049 \pm 0,000$ ^{I b}	$4,61 \pm 0,06$ ^{I a}	$7,33 \pm 0,01$ ^{III b}	1,00	0,06
	1 %	NL ^{I a}	$0,059 \pm 0,001$ ^{I c}	$4,64 \pm 0,02$ ^{I/II a}	$7,44 \pm 0,01$ ^{III b}	0,99	0,07
	3 %	$1,4 \pm 2,4$ ^{I a}	$0,053 \pm 0,001$ ^{II b}	$4,75 \pm 0,09$ ^{I a}	$7,29 \pm 0,01$ ^{II/III b}	1,00	0,06
	6 %	$2,3 \pm 3,2$ ^{I/II a}	$0,022 \pm 0,001$ ^{II a}	$4,73 \pm 0,07$ ^{I/II a}	$6,44 \pm 0,08$ ^{II a}	0,98	0,08
	p-verdi	p<0,05	p<0,001	p<0,01	p<0,001		
<i>P. phosphoreum</i> Av108	0 %	$1,4 \pm 2,5$ ^{I a}	$0,052 \pm 0,001$ ^{I/II b}	$4,68 \pm 0,11$ ^{I a}	$7,18 \pm 0,02$ ^{II b}	0,99	0,08
	1 %	$1,4 \pm 2,4$ ^{I a}	$0,061 \pm 0,003$ ^{I/II c}	$4,75 \pm 0,11$ ^{II a}	$7,32 \pm 0,01$ ^{II c}	1,00	0,06
	3 %	NL ^{I a}	$0,055 \pm 0,000$ ^{II bc}	$4,69 \pm 0,00$ ^{I a}	$7,19 \pm 0,02$ ^{I/II b}	1,00	0,06
	6 %	$11,3 \pm 1,5$ ^{III b}	$0,016 \pm 0,000$ ^{II a}	$4,74 \pm 0,05$ ^{II a}	$5,62 \pm 0,01$ ^{I a}	0,92	0,09
	p-verdi	p<0,01	p<0,001	p<0,01	p<0,001		
<i>P. piscicola</i> Sm58	0 %	$4,2 \pm 2,0$ ^{I a}	$0,054 \pm 0,002$ ^{I/II c}	$4,69 \pm 0,13$ ^{I a}	$7,21 \pm 0,01$ ^{IV b}	1,00	0,07
	1 %	$1,0 \pm 1,7$ ^{I a}	$0,060 \pm 0,000$ ^{I c}	$4,69 \pm 0,10$ ^{I/II a}	$7,34 \pm 0,01$ ^{IV c}	1,00	0,05
	3 %	$1,4 \pm 1,9$ ^{I a}	$0,041 \pm 0,002$ ^{I b}	$4,82 \pm 0,04$ ^{I a}	$7,13 \pm 0,01$ ^{III/IV b}	1,00	0,04
	6 %	$1,7 \pm 1,5$ ^{I a}	$0,019 \pm 0,000$ ^{II a}	$4,77 \pm 0,04$ ^{II a}	$6,48 \pm 0,01$ ^{II a}	0,98	0,07
	p-verdi	p<0,05	p<0,001	p<0,01	p<0,001		
<i>P. piscicola</i> Sv37	0 %	NL ^{I a}	$0,052 \pm 0,001$ ^{I/II b}	$4,55 \pm 0,02$ ^{I a}	$7,12 \pm 0,01$ ^{I b}	0,98	0,11
	1 %	NL ^{I a}	$0,060 \pm 0,003$ ^{I/II c}	$4,62 \pm 0,03$ ^{I/II ab}	$7,27 \pm 0,00$ ^{I c}	0,99	0,07
	3 %	NL ^{I a}	$0,053 \pm 0,001$ ^{II bc}	$4,70 \pm 0,05$ ^{I ab}	$7,26 \pm 0,01$ ^{II c}	0,99	0,07
	6 %	$0,9 \pm 1,6$ ^{I a}	$0,025 \pm 0,000$ ^{II a}	$4,68 \pm 0,04$ ^{I/II b}	$6,43 \pm 0,02$ ^{II a}	0,96	0,11
	p-verdi	p<0,05	p<0,001	p<0,01	p<0,001		
p-verdi	0 %	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,001		
	1 %	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,001		
	3 %	p<0,01	p<0,01	p<0,05	p<0,001		
	6 %	p<0,01	p<0,001	p<0,05	p<0,001		

3 Enveis ANOVA og Tukey's-b ble brukt til å finne signifikante forskjeller på stamme- og temperaturnivå. Små bokstaver (abc) viser signifikante forskjeller mellom temperaturene for samme stamme med tilhørende p-verdi rett under i samme boks. Romertall (I/II/III) viser signifikante forskjeller mellom stammene ved en gitt temperatur. For hver temperatur er p-verdien angitt i nederste boks i tabellen. NL = ingen lagfase.

5 Diskusjon

For å kartlegge betydningen av *Photobacterium* spp. for holdbarheten til lett prosesserte rødspette produkter var det ønskelig å identifisere 54 *Photobacterium* isolater fra rødspette på artsnivå. I tillegg var hensikten å undersøke variasjonen i artenes toleranse for ulike prosessfaktorer og mulige variasjoner på grunn av fangstsesong og isolasjonsatmosfære. Dette har stor betydning for å utvikle optimale barrierer som er tilpasset vekstpotensialet til aktuelle *Photobacterium* spp. Ulik toleranse for hemmende faktorer kan påvirke stammens vekstevne og dermed produktets holdbarhetstid.

Genotypisk karakterisering av 54 *Photobacterium* stammer ble derfor utført ved sekvensanalyse av tre husholdningsgener (*gyrB*, *gapA* og *recA*) og 16S rRNA-genet. Screening av vekst ved ulike miljøforhold (temperatur, salt og CO₂) og generering av bioluminescens ble utført for alle de 54 isolatene for å undersøke toleransen ovenfor aktuelle prosesseringsfaktorer av lett prosessert rødspette og kartlegge eventuelle sesong og isolasjonsatmosfære baserte forskjeller. Videre ble en vekstkinetikk studie utført med seks *Photobacterium* stammer av hver identifisert art, for å kartlegge eventuelle forskjeller i vekst på artsnivå. I tillegg til å ytterlig analysere stammens toleranse for ulike temperaturer (4, 8, 12 og 16 °C) og saltkonsentrasjoner (0, 1, 3 og 6 % NaCl).

5.1 Genotypisk identifisering av *Photobacterium* stammer

Ved 16S rRNA gensekvensering ble 54 stammer isolert fra L&H identifisert som *Photobacterium* spp., men metoden kunne ikke separere stammene på artsnivå. Sekvensering av 16S rRNA sekvensene resulterte i klassifisering av 26 stammer som *P. phosphoreum*, 12 som *P. piscicola*, 10 som *P. carnosum* og 6 som *P. kishitanii* (ID % > 99). Det fylogenetiske treet viste ingen tydelig gruppering i henhold til stammens artsklassifisering. Både *P. phosphoreum*, *P. kishitanii*, *P. carnosum* og *P. piscicola* stammer var spredt over det fylogenetiske treet og gruppert med ulik klassifiserte stammer. Dessuten vistes nesten ingen bootstrap verdier over 70 %, noe som gir lav pålitelighet for korrekt artsbasert gruppering av stammene (Gevers et al., 2005; Ojha et al., 2022).

Det er tidligere dokumentert et nært beslektet forhold mellom *P. iliopiscarium*, *P. phosphoreum* og *P. kishitanii* artene og at 16S rRNA sekvenseringsanalyse ikke kan skille artene (Figge et al., 2014; Urbanczyk et al., 2011). I de konserverte delene av 16S rRNA genen er det påvist lite sekvensendringer over lange tidsperioder. Det kan derfor være for lite diversitet i 16S rRNA

genet for å kunne skille mellom nylig divergerte arter (Ast & Dunlap, 2004). Spredning av *Photobacterium* stammer i det fylogenetiske treet basert på 16S rRNA sekvenser kan dermed tyde på høy intraspesifikk sekvenslikhet i 16S rRNA genet (Ast & Dunlap, 2004; Urbanczyk et al., 2011). I motsetning til proteinkodende husholdningsgener er flere kopier av 16S rRNA-genet tilgjengelig i bakterienes genom, slik at 16S rRNA sekvensering var egnet for å verifisere at stammene tilhørte *Photobacterium* slekten i denne studien (Ast & Dunlap, 2004; Urbanczyk et al., 2011).

På grunn av lav oppløsning i 16S rRNA sekvensanalysen har multilokus sekvensanalyse blitt benyttet for klassifisering av *Photobacterium* stammer på artsnivå (Figge et al., 2014; Labella et al., 2017; Urbanczyk et al., 2011). Husholdningsgener benyttet i slike analyser har vært *gyrB*, *gapA* og *recA* (Ast et al., 2007; Figge et al., 2014). Det har blitt dokumentert gode resultater ved sekvensanalyse av *gyrB* genet og klassifisering av de fleste for øyeblikket anerkjente *Photobacterium* artene (Yamamoto et al., 2000; Dauga, 2002; Yáñez et al., 2003). Ast & Dunlap (2005) viste eksempelvis at sekvenseringsanalyse med flere husholdningsgener (*gyrB* og *luxAB(F)E*) bidro til betydelig mer opplysning i artsidentifikasjonen sammenlignet med 16S rRNA sekvensanalyse. Dette ved at stammene hadde tettere gruppering i de fylogenetiske trærne basert på husholdningssekvenser, sammenlignet fylogenetiske trær basert på 16S rRNA sekvensering. I tillegg vist det at sekvensering av sammensatte sekvenser fra *gyrB* og 16S rRNA ikke var tilstrekkelige til å skille mellom nært beslektete arter (*P. kishitanii*, *P. phosphoreum* og *P. iliopiscarium*), noe som belyser fordeler med bruken av flere husholdningsgener.

Basert på *gyrB*, *gapA* og *recA* sekvenseringen i denne studien ble 22 stammer identifisert som *P. phosphoreum* (ID % 98), 29 stammer som *P. iliopiscarium* (ID % 98) og 3 stammer som *P. piscicola* (ID % 98). Til tross for en lavere identifikasjonsprosent enn ved 16S rRNA analysen (ID 99 %) ble det vist tydeligere gruppering og høyere bootstrap verdier (>99 %) i de fylogenetiske trærne basert på husholdningsgenene. I motsetning til at ingen av stammene ble identifisert som *P. iliopiscarium* basert på 16S rRNA sekvensering, ble flertallet av stammene klassifisert som *P. iliopiscarium* ved husholdningsgen sekvenseringen. 16S rRNA viser dermed å ha et svakere identifikasjonspotensial for *P. iliopiscarium*, noe som samsvarer med tidligere studier hvor *P. iliopiscarium* stammer ble feilidentifisert som *P. phosphoreum* (Dalgaard et al., 1999; Dalgaard et al., 1997). Ast & Dunlap (2004) dokumenterte tilsvarende at *P. iliopiscarium* identifiserte stammer ble grupperte sammen med *P. phosphoreum* stammer, og ikke dannet en egen gruppe ved siden av *P. phosphoreum*. I nyere tid har sekvenseringsanalyse av flere

husholdningsgen av *Photobacterium* spp. gitt betydelig bedre resultater for å skille mellom disse artene (Urbanczyk et al., 2011).

Den tredje observerte hovedgruppen i alle de fylogenetiske trærne basert på husholdningsgen sekvensene inkluderte tre *P. piscicola* klassifiserte stammer. Disse dannet en hovedgruppe sammen med syv referanse stammer av *P. leiognathi*, *P. mandapamensis*, *P. angustum*, *P. aquamaris*, *P. kishitanii*, *P. indicum* og *P. piscicola* (bootstrap verdi 100 %). Den tette grupperingen av referansestammene indikerer dermed et nært beslektet forhold mellom disse artene. Videre danner *P. piscicola* stammene en undergruppe sammen med referanse stammen av *P. piscicola* (bootstrap verdi 100 %) i nesten alle de fylogenetiske trærne.

Macé et al. (2013) dokumenterte at sekvensering av *gyrB* genot ikke identifiserte *P. piscicola* på grunn av fire basepars forskjell fra målsekvensen. Til tross for det ble tre stammer i denne studien klassifisert som *P. piscicola* basert på sekvenseringsanalyse av både *gyrB*, *gapA* og *recA*. I tillegg viste de fylogenetiske trærne tydelig gruppering mellom *P. piscicola* stammene og *P. leiognathi*, *P. mandapamensis*, *P. angustum*, *P. aquamaris*, *P. kishitanii* og *P. indicum* referanse stammene. Ettersom alle de tre *P. piscicola* stammene ble klassifisert som *P. phosphoreum* ved 16S rRNA sekvenseringsanalyse, kan dette tyde på lavere diversitet i 16S rRNA genot og vanskeligheter med korrekt artsidentifikasjon av *P. phosphoreum* og *P. piscicola* stammer.

Denne studien påviste høyest forekomst av *P. iliopiscarium* arten (29 stammer), etterfulgt av *P. phosphoreum* (22 stammer). Disse artene kan dermed ha størst betydning for holdbarheten av MAP, vakuum og luftlagret rødspette. *P. piscicola* hadde lavere forekomst (3 stammer), og kan dermed ha mindre betydning enn de to andre artene. Videre vistes i samsvar med litteraturen at 16S rRNA sekvenseringen ga utfordringer med å skille mellom nært beslektede arter som *P. iliopiscarium*, *P. phosphoreum*, og *P. kishitanii*. Dessuten tyder dette på fylogenetiske likhetstrekk mellom stammer innen *Photobacterium* slekten. Sammenlignet med 16S rRNA gensekvensering alene viste sekvenseringsanalysen av flere husholdningsgener (*gyrB*, *gapA* og *recA*) et økt identifikasjonspotensiale av *P. piscicola*, *P. iliopiscarium* og *P. phosphoreum*. Ettersom multilokus analyse vanligvis inkluderer opptil syv husholdningsgen kan sekvensering av flere husholdningsgen være aktuelt for å sammenligne og støtte resultatene i denne studien. Lux operonet, et lokus som har divergerte raskere enn både 16S rRNA og *gyrB* genot, har eksempelvis blitt rapportert til å gi gode sekvenseringsresultater. Dessuten kan flere andre husholdningsgener (f.eks. *pyrA*, *pyrH*, *ftsZ*, *topA*, *mreB*, *rpoA*) tas i betraktning for ytterlig kartlegging av de genetiske forholdene mellom *Photobacterium* stammene. (Figge et al., 2014)

Videre kan det være aktuelt å konstruere fylogenetiske trær ved bruk av maximum likelihood metoden. Dette ettersom neighbour-joining metoden klynger sekvenser og benytter tilfeldige samplinger (bootstrap replikasjoner), noe som reduserer nøyaktigheten til det fylogenetiske treet. Maximum likelihood metoden krever en økt regnekraft enn neighbour-joining metoden, men minimere dermed estimeringsfeil og gir økt nøyaktighet (Stamatakis et al., 2005).

5.2 Fenotypisk karakterisering av *Photobacterium* stammer

5.2.1 Effekt av temperatur på *Photobacterium* stammer

Basert på at alle stammene var i stand til å vokse på TSA med 1 % NaCl ved 4-20 °C, ble det videre undersøkt vekstkinetikk parametere til seks utvalgte stammer ved 4, 8, 12 og 16 °C i TSB med 1 % NaCl. Basert på fylogenetisk identifisering ble to stammer av hver art valgt; *P. iliopiscarium* (Am135 og Aw66), *P. phosphoreum* (Av108 og Sw30) og *P. piscicola* (Sm58 og Sv37). Hensikten var å kartlegge eventuelle variasjoner i deres vekstpotensial som funksjon av temperatur og artsrelaterte forskjeller. Vekstkinetikk parametere generert gjennom primærmodellen til Baranyi og Roberts (1994) viste slik som screeningsforsøket god vekst ved alle temperaturer (4-16 °C). Videre hadde kun en stamme (*P. iliopiscarium* Aw66) lagfaser ved 4 og 8 °C, mens ingen lagfaser ble observert for de andre fem stammene. Bakteriens tilpasningsdyktighet til nye miljø påvirkes av hvor mye stress de har blitt utsatt for under dyrking. Rask adaptasjon kan dermed indikere lite utsettelse for stress (Doyle, Diez-Gonzalez og Hill, 2019). I tillegg er *Photobacterium* dokumentert til å vokse over et bredt temperaturområde (2-34 °C). Dette samsvarer dermed med den raske adaptasjonsevnen og god vekst ved høye og lave temperaturer (4-16 °C). (Eyjólfur Reynisson et al., 2009; Dalgaard, Manfio, et al., 1997; Figge et al., 2014)

Vekstkinetikk parametere mellom stammene viser relativt lik vekst mellom alle stammene. Signifikante forskjeller vises kun på et innsnevret nivå. Ved den laveste temperaturen (4 °C) ble ingen signifikante forskjeller observert i veksthastigheten mellom stammene. Signifikante forskjeller ble derimot observert ved 8 °C, hvor *P. iliopiscarium* Am145 hadde signifikant raskere vekst enn de andre stammene. Ved de to høyere temperaturene (12 og 16 °C) hadde *P. piscicola* Sm58 raskest vekst, og nådde i tillegg de høyeste sluttkonsentrasjonene ved alle temperaturene (4-16 °C). *P. piscicola* Sm58 viste også høyest respons på høy temperatur basert på Ratkowsky kvadratrotmodellen (1982), mens *P. iliopiscarium* Am135 og Sw30 viste lavest respons på høy temperatur. Alle stammene nådde relativt like sluttkonsentrasjoner (7,094-7,238

kde/g) i alle temperaturene (4-16 °C). Ved 4 °C kom alle stammene senere i den stasjonære vekstfasen (ca. etter 48 timer) enn ved 8 °C (ca. etter 33 timer). Sammenlignet med de to høyeste temperaturene (12 og 16 °C) hadde stammene en betydelig lavere veksthastighet ved 4 °C (ca. 1/3) og brukte 2 ganger så lang tid for å komme i den stasjonære vekstfasen.

Resultatene viser dermed lite artsbasert variasjon i vekstkinetikken og at stammene innenfor samme art oppfører seg relativt likt (*P. iliopiscarium*, *P. phosphoreum* og *P. piscicola*). Videre inkluderte vekstkinetikk forsøket kun to stammer av hver art, derfor er gjennomføring av vekstkinetikk studier med flere stammer av hver er nødvendig for å kunne bekrefte resultatene.

Artsbasert forskjeller i vekstkinetikk er imidlertid presentert av (Fuertes-Perez et al., 2019) mellom *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* og *P. carnosum* stammer isolert fra kjøtt. De fant at *P. phosphoreum* vokste signifikant raskere enn *P. carnosum* og *P. iliopiscarium* i kjøttsimuleringsmedie ved 4 °C. Videre hadde *P. phosphoreum* og *P. iliopiscarium* stammer lange lagfaser (21-55 timer) sammenlignet med ingen lagfaser i denne studien. Ettersom denne studien presenterte artsbaserte forskjeller mellom kjøttisolerte stammer, vil det trolig være forskjeller i stammens vekst sammenlignet med sjømat isolerte stammer. Samtidig indikerer dette at artsbasert variasjon mellom *Photobacterium* arter fra rødspette ikke er utelukket. Gjennomføring av vekstkinetikk studier med flere av *Photobacterium* stammene kan være aktuelt for videre studier.

Artsbaserte forskjeller ved høy temperatur er tidligere dokumentert ved at *P. kishitanii* klassifiserte stammer er mindre varmetolerant (vokser ved 5-29 °C) enn og *P. angustum* stammer (5-34 °C) (Bjornsdottir-Butler et al., 2016). I denne studien vises det at en *P. piscicola* identifisert stamme hadde høyest respons på høy temperatur, mens to *P. phosphoreum* identifisert stammer og en *P. iliopiscarium* identifisert stamme hadde lavest respons på høy temperatur. For å kunne påvise om dette er på grunn av artsbaserte forskjeller, eller kun variasjon mellom stammer er vekstkinetikk studier med flere stammer av hver art nødvendig.

Videre ble kartlegging av stammenes vekstegenskaper gjort i sterilt TSB medium som representerer et stabilt miljø som støtter bakteriens vekst. Dette er et modellsystem som ikke direkte kan sammenlignes med vekstmiljøet i rødspette. For å bedre kartlegge vekstkinetikk parametere i lettprosesserte rødspette produkter kan det gjennomføres inokuleringsforsøk med *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* og *P. piscicola* i steril fiskejuice tillaget fra fiskemuskel (Stupar et al., 2021) eller eventuell inokulering direkte i rødspette muskel. Et modellsystem av fiskejuice vil bedre etterligne et reelt fiskeprodukt enn vekst i TSB, men det er vanskeligere å

standardisere et slikt system fra gang til gang. Vekstforsøk i fiskemuskel forstyrres ofte av den naturlige mikrobiotaen som er til stede og det er derfor vanskelig å fastsette vekstkinetikk parameter for de inokulerte stammene (Stupar et al., 2021).

I løpet av vekstkinetikk forsøket viser pH målingene negativ korrelasjon mellom bakterievekst (målt kde/g) og nedgang i pH. Slutt pH-en ble målt mellom 5,82 og 6,22 uten signifikante forskjeller mellom stammene eller temperaturene. I en studie med isolater fra MA-pakket svinekjøtt ble det observert en større pH-endring av *P. phosphoreum* stammer på 5,4 til 6,4 (Nieminen et al., 2016). Fuertes-Perez et al. (2019) dokumentert høyere pH verdier og artsrelatert variasjon mellom *P. phosphoreum* (opp til pH 5,62-7,47) og *P. iliopiscarium* (pH 6,32-6,56) og *P. carnosum* (5,43–7,08). Økning i pH og artsbasert variasjon i pH kan ha betydning for forringelsen av rødspette produkter. Dette ettersom pH økning indikerer produksjon av biogene aminer og ammoniakk fra aminosyremetabolismen. I tillegg har *Photobacterium* spp. evnen til å produsere histamin og andre biogene aminer i fisk (Jorgensen et al., 2000).

Hemmet vekst av stammene ved 4 °C ble oppnådd i både screenings- og vekstkinetikk forsøkene. Samtidig vist i samsvar med andre studier at det ikke ble oppnådd fullstendig hemmet vekst. Kombinering med flere barrierer kan dermed være nødvendig for å oppnå utvidet holdbarhet på lett prosessert rødspette. I tillegg kan inkubering ved lavere temperaturer enn 4 °C være aktuell for å oppnå en ytterlig hemmende effekt mot *Photobacterium* spp. Olafsdottir et al. (2006) dokumenterte eksempelvis en betraktelig utvidet holdbarhet av hyse fileter (*Melanogrammus aeglefinus*) ved lagring ved 0 °C (13,5 dager) sammenlignet med lagring ved 7 °C (6,5 dager), med et antall på 8,0 kde/g *P. phosphoreum* bakterier ved de siste holdbarhetsdagene. Inkubering av de 54 *Photobacterium* stammene ved 0 °C kan dermed tas i betraktning ved videre forsøk for å oppnå økt holdbarhetstid på rødspette produkter.

5.2.2 Effekt av NaCl på vekst av *Photobacterium* stammer

Resultatene fra screeningsforsøket med ulike saltkonsentrasjoner (0, 3 og 6 % NaCl) og temperaturer (4 og 15 °C) viste at stammene ble betydelig mer hemmet på TSA med 0, 1 og 3 % NaCl ved lavere temperaturer (4 °C) sammenlignet med høyere temperaturer (15 °C). Fullstendig hemmet vekst ble samtidig kun observert hos 2 av stammene ved 4 °C og 0 % NaCl. Sammenlignet med inkubering med 1 % NaCl vist mer vekst enn med 0 og 3 % NaCl ved både 4 og 15 °C, slik at dette kan tyde på en mer hemmende effekt ved disse

saltkonsentrasjonene. Ved den høyeste saltkonsentrasjonen (6 % NaCl) ble betydelig mer hemmet vekst observert, sammenlignet med de lavere saltkonsentrasjonene, og veksten ble fullstendig hemmet hos 39 stammer ved 4 °C og 20 stammer ved 15 °C. Ettersom saltkonsentrasjoner på 0 og 1 % NaCl er aktuelle prosessfaktorer i lett prosessert hvit fisk, inkludert rødspette (Helsedirektoratet, 2019), var det relevant å undersøke toleransen av *Photobacterium* stammene for disse saltkonsentrasjonene. I tillegg ble toleransen for høyere saltkonsentrasjoner (3 og 6 % NaCl) undersøkt ettersom disse har vist å hemme veksten hos de fleste *Photobacterium* stammene (Figge et al., 2014). Videre var det av interesse å undersøke eventuelle artsbaserte forskjeller mellom stammenes vekst i de ulike saltkonsentrasjonene. Derfor ble de samme seks stammene (Am135, Aw66, Av108, Sw30, Sm58 og Sv37) som i temperatur vekstkinetikk forsøket brukt til å analysere vekstkinetikk parametere i TSB med 0, 1, 3 og 6 % NaCl ved 4 °C. Her ble 4 °C valgt som inkuberingsstemperatur ettersom det er en aktuell kjøletemperatur for lett prosessert rødspette.

I dette forsøket hadde alle stammene lagfaser ved 6 % NaCl, noe som indikerer hemmet vekst for alle stammene ved høye saltkonsentrasjoner. Fire av stammene (*P. piscicola* Sm58, *P. iliopiscarium* Am135, *P. phosphoreum* Sw30 og Av108) hadde i tillegg lagfaser i 0, 1 og 3 % NaCl, noe som indikerer at disse ble mer hemmet ved lave saltkonsentrasjoner enn de to andre stammene (*P. iliopiscarium* Aw66 og *P. piscicola* Sv37). Dette indikerer variasjon i stammenes tilpasningsdyktighet til 0, 1 og 3 % NaCl og variasjon mellom stammene innen samme art. Store standardavvik ($\pm 4,3$ kde/g) for noen stammer indikerer ulikheter mellom parallellene ($n=3$) og kan skyldes store tidsrom mellom OD-målinger av parallellene (Papadimitriou et al., 2016).

Sammenlignet med de tre laveste saltkonsentrasjonene ble veksten til alle stammene betydelig mer hemmet i 6 % NaCl. I 0, 1 og 3 % NaCl ble det observert relativ lik vekst mellom alle stammene. Dette i motsetning til at Figge et al. (2014) dokumenterte hemmet eller ingen vekst av *Photobacterium* stammer i 0 % NaCl. Samtidig hadde alle stammene raskest veksthastighet, nådde høyest sluttkonsentrasjon og kom tidligst i stasjonær vekstfase i 1 % NaCl. Ettersom stammene ble inokulert i TSB med 1 % NaCl 24 timer før tilsetning i 0, 1, 3 og 6 % NaCl, kan dette ha medført tilpasning av bakteriene til denne saltkonsentrasjonen og dermed økt vekst i forhold til de andre saltkonsentrasjonene. Samtidig kan dette også indikerer høyere toleranse for 1 % NaCl, sammenlignet med 0 og 3 % NaCl.

Slik som for vekstkinetikk studien ved ulike temperaturer (4-20 °C), ble det observert relativt lite variasjon mellom stammene i 0, 1, 3 og 6 % NaCl og dermed ingen artsbasert variasjon. Kun i 6 % NaCl ble *P. phosphoreum* Av108 betydelig mer hemmet enn resten av stammene, noe som indikerer variasjon innad i *P. phosphoreum* arten. Videre vist forskjeller innad i *P. iliopiscarium* arten ved at *P. iliopiscarium* Aw66 hadde signifikant raskere veksthastighet i både 0 og 1 % NaCl enn de andre stammene. I tillegg hadde *P. phosphoreum* Am135 signifikant høyere veksthastighet i 3 % NaCl enn alle de andre stammene, mens *P. phosphoreum* Sw30 og *P. piscicola* Sm58 hadde signifikant lavere veksthastigheter i 1 og 3 % NaCl.

Variasjon i toleransen for saltkonsentrasjoner innen *Photobacterium* slekten er ofte knyttet til bakteriens ulike habitater. Ulike saltkonsentrasjoner forekommer i ulike habitater og krever ulik tilpasning (Kuts & Ismailov, 2009; Makiguchi et al., 1980; Waters & Lloyd, 1985). Ettersom alle stammene i denne studien ble isolert fra det samme geografiske området, kan dette være en årsak for at stammene har relativt lik toleranse for de ulike saltkonsentrasjonene og at det ikke ble observert artsbasert variasjon. Variasjon mellom *Photobacterium* arter er imidlertid dokumentert ved bakteriens optimale saltkonsentrasjoner for vekst. Bjornsdottir-Butler et al. (2016) dokumenterte en optimal saltkonsentrasjon på 1 % NaCl for *P. kishitanii* og 2 % NaCl for *P. angustum*, mens Watanabe & Hastings (2004) fant at både 1 og 3 % NaCl var optimale saltkonsentrasjoner for vekst av *P. phosphoreum*. Videre observerte Figge et al., (2014) økt toleranse ovenfor høye saltkonsentrasjoner hos *P. piscicola* sammenlignet med *P. phosphoreum* og *P. iliopiscarium*.

I lettprosessert fisk er saltkonsentrasjonen vanligvis mellom ca. 0,4 og 2,0 % NaCl (Helsedirektoratet, 2019; E. Reynisson et al., 2009). Både screenings- og vekstkinetikk forsøket viste at *P. iliopiscarium*, *P. phosphoreum* og *P. piscicola* var i stand til å vokse ved disse prosessfaktorene (0 og 1 % NaCl ved 4 °C). Tilsvarende dokumenterte (E. Reynisson et al., 2009) at *P. phosphoreum* var den dominerende bakterieslekten i lettsaltet (0,4 % NaCl) torsk lagret ved lav temperatur (0 °C). Samtidig viste screeningsforsøket og vekstkinetikk studien at 0 % NaCl hadde en litt mer hemmende effekt enn 1 % NaCl ved 4 °C, slik at lavere saltkonsentrasjoner (< 1 % NaCl) kan bidra til hemmet vekst. Screeningsforsøket viste i tillegg betydningen av kjøletemperaturer for å oppnå hemmet vekst 0 og 3 % NaCl ettersom betydelig mindre vekst ble observert ved 4 °C enn ved 15 °C. I tillegg til kjølelagring og lettsalting av rødspette er anvendelsen av flere kombinerte barrierer mot *Photobacterium* spp. svært aktuelt for å oppnå en utvidet holdbarhetstid.

5.2.3 Effekt av CO₂ på vekst av *Photobacterium* stammer

For lett prosesserte fiskeprodukter, inkludert rødspette, brukes MAP som en viktig barriere mot mikrobiell aktivitet. *Photobacterium* spp. tolererer imidlertid høye CO₂ konsentrasjoner og er dokumentert som den viktigste forringelsesorganisme og begrensende holdbarhetsfaktoren i kjølelagret MAP produkter (> 60 % CO₂ som start konsentrasjon ved pakking) (Macé et al., 2013; Sivertsvik et al., 2002). Kartlegging av stammens toleranse ovenfor høye CO₂ konsentrasjoner (100 %) i kombinasjon med ulike temperaturer (4 og 15 °C) ble derfor undersøkt i denne studien. Screening av stammenes vekst under CO₂ indusert atmosfære ved 4 °C viste en hemmende effekt på vekst sammenlignet med inkubering i luft. Samtidig ble fullstendig inhibert vekst kun observert hos fire stammer i kombinasjon med 4 °C. Ved 15 °C hadde CO₂ indusert atmosfære sammenlignet med luft derimot ingen betydelig hemmende effekt på vekst. Dette kan være forårsaket av at løseligheten til CO₂ avtar i mediet ved høye temperaturer, slik at en mindre hemmende effekt oppnås på vekst (Sivertsvik et al., 2002).

Av alle miljøfaktorene som ble analysert i screeningsforsøket hadde lav temperatur (4 °C) i kombinasjon med CO₂ den mest hemmende effekten på vekst. Disse faktorene kan dermed bidra til å hemme *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* og *P. piscicola* i lettprosessert rødspette. Samtidig ble det i samsvar med andre studier ikke oppnådd en fullstendig hemmende effekt (Lerfall et al., 2018). Spesielt *P. phosphoreum* er påvist som dominerende forringelsesorganisme i MAP ved lave temperaturer og dokumentert som begrensende holdbarhetsfaktor. Kombinasjon av MAP med flere barrierer kan dermed være aktuelt. Altieri et al., (2005) dokumenterte eksempelvis at MAP eller vakuum i kombinasjon med biokonservering og lave temperaturer var effektive barrierer mot *P. phosphoreum* i rødspette (*Pleuronectes platessa*). Ved 4 °C og vakuum hadde både thymol i kombinasjon med *B. bifidum*, og *B. bifidum* alene en tydelig hemmende effekt på vekst av *P. phosphoreum* (3 log kde/g reduksjon). Videre vistest at alle kombinasjonene hadde en mer hemmende effekt ved 4 °C enn ved 12 °C. Ved bruk av MAP i kombinasjon med andre milde konserveringsmetoder vises dermed at temperaturkontroll er av stor betydning for at fordelene med MAP og andre barrierer ikke går tapt (Sivertsvik et al., 2002).

Videre har superkjøling i kombinasjon med MAP også blitt dokumentert til å ha en betydelig hemmende effekt på vekst av *Photobacterium* spp. (E. Reynisson et al., 2009; Sørensen et al., 2020). Ved bruk av MAP i kombinasjon med superkjøling på -4 °C ble betydelig mer hemmet vekst oppnådd sammenlignet med både 0 og -2 °C og i kombinasjon med luft, noe som kan

indikere at så lave temperaturer som $< -2\text{ °C}$ er nødvendig for å hente ut den beste effekten av MA-pakkingen (Abel et al., 2022; E. Reynisson et al., 2009).

5.3 Effekt av fangstsesong og isolasjonsatmosfære på vekst av *Photobacterium* stammer

Resultatene fra screeningsforsøket ved inkubering på TSA med 1 % NaCl ved 4-20 °C indikerte forskjeller i vekstegenskaper mellom isolater fra de ulike fangstsesongene. Stammer isolert i april hadde gjennomsnittlig signifikant mer vekst enn stammer isolerte i september. Resultatene fra screeningsforsøket med ulike saltkonsentrasjoner viste derimot at stammer isolert i april hadde gjennomsnittlig mer vekst enn stammer som ble isolert i september ved inkubering i 0 og 3 % NaCl (15 °C) og i 3 og 6 % NaCl (4 °C), men at stammer isolerte i april hadde mindre vekst ved i 6 % NaCl (15 °C) og i 0 % NaCl (4 °C).

Andre studier har dokumentert et høyere total kimtall på fisk fanget i januar (9 kde/g) sammenlignet med august (7 kde/g) (Grigorakis et al., 2003). Forskjeller i stammens tilpasningsdyktighet kan være relatert til stammens naturlige miljøforhold ved isolasjonstidspunktet, inkludert sjøvannstemperatur. Ved isolasjonstidspunktet av *Photobacterium* stammene i denne studien var sjøvannstemperaturen 5 °C i april og 15 °C i september. Økt vekst hos bakterier isolert på vinteren kan være knyttet til økt motstandsdyktighet og bedre adaptasjon til lave inkubasjonstemperaturer (4 og 8 °C). Samtidig hadde stammer isolert i april mest vekst ved høyere temperaturer (15 og 20 °C) i denne studien. Dette kan skyldes at stammer som ble isolert fra kaldere sjøvann generelt hadde bedre tilpasningsdyktighet (Grigorakis et al., 2003).

Resultatene fra screeningsforsøket ble basert på en subjektiv evalueringsmetode som kan ha tilført usikkerhet til resultatene. Metoden innebar å bedømme stammens vekst subjektivt fra 0 til 3. For noen stammer var det dermed eksempelvis vanskelig å bedømme om veksten tilsvarte en 2er eller 3er. Dette medførte utføring knyttet til nøyaktig evaluering. Ettersom screeningen var et omfattende forsøk, ble denne metoden valgt for å spare tid, men kvantifisering av kolonier i log kde/g kunne gitt et bedre grunnlag for resultatbehandling av stammens vekst. Ved statistiske resultatbehandlinger ble det beregnet høye standardavvik (opptil 0,76) for noen grupper, noe som indikerer relativ stor variasjon i vekst mellom stammene som ble isolert under den samme sesongen.

Screeningsforsøket indikerte bare lite forskjeller mellom stammer isolert fra ulike gassblandinger (MAP, vakuum, luft) under inkubering ved 4, 8 og 15 °C. Her hadde vakuum isolerte stammer gjennomsnittlig litt mer vekst enn MAP og luft isolerte stammer. Ved inkubasjon i ulike saltkonsentrasjoner (0, 3 og 6 % NaCl) og ved 4 og 15 °C ble derimot ingen forskjeller observert i vekst mellom stammer isolert fra ulike atmosfærer. Dessuten vistest også her relativt store standardavvik og dermed variasjon mellom stammene isolert fra den samme atmosfæren. Dermed gir dette indikasjon på lite påvirkning av isolasjonsatmosfæren for deres vekst.

Variasjon i bakteriens vekstevne knyttet til sesong og isolasjonsatmosfære kan ha betydning for forringelse av *Photobacterium* spp. i lettprosesserte rødspette og dermed på produktets holdbarhetstid. Avhengig av ulike fangstsesonger for rødspette til konsum vil *Photobacterium* stammene kunne være mer motstandsdyktige mot hemmende faktorer i produktet. Dette gjelder også for bruk av ulike gass sammensetninger i produktemballasjen som vakuum eller CO₂. Ytterligere studier for kartlegging av dette kan dermed være aktuelt.

5.4 Evnen til å generere bioluminescens hos *Photobacterium* stammer

For å analysere stammenes evne til å generere bioluminescens og kartlegge eventuelle artsbaserte forskjeller ble alle stammene dyrket på L&H med 1 % NaCl ved 4, 8, 12 og 20 °C. Hos de fleste *P. phosphoreum* stammene (19 av 23) ble bioluminescens observert etter fire dager, ved både lave og høyere temperaturer, mens flere hadde mistet bioluminescensen etter syv dager. Andre studier dokumenterte tilsvarende at *P. phosphoreum* ofte inkluderte bioluminescens dannende stammer (Labella et al., 2017; Parte, 2014; Urbanczyk et al., 2011), men at det også ble observert tap av bioluminescens og motilitet (Flodgaard et al., 2005).

Inkubering ved lave saltkonsentrasjoner (0 og 1 % NaCl) er imidlertid rapportert som en inhiberende faktor for dannelsen av bioluminescens (Watanabe & Hastings, 2004; Figge et al., 2014; Kuts & Ismailov, 2009). Ved screening kan 1 % NaCl dermed vært en mer inhiberende faktor for de *P. phosphoreum* stammene som ikke genererte bioluminescens. Videre har 15 °C blitt observert som optimal temperatur, noe som samsvarer med at flere stammer dannet bioluminescens ved 15 °C etter syv dager sammenlignet med høyere eller lavere temperaturer (Kuts & Ismailov, 2009).

Videre ble bioluminescens observert hos 1 av 3 *P. piscicola* stammer etter fire og syv dager ved nesten alle temperaturene. Figge et al. (2014) dokumentert at *P. piscicola* stammer genererte bioluminescens etter 2-3 dager på TSA med 3 % NaCl og inkubering ved 20 °C, men at ingen

bioluminescens ble påvist på TSA uten tilsatt salt. De to *P. piscicola* stammene som ikke genererte bioluminescens kan dermed hatt en lavere toleranse for lave saltkonsentrasjoner (1 % NaCl), noe som indikerer variasjon mellom stammenes evne til å generere bioluminescens innen *P. piscicola* arten.

Selv om Ast & Dunlap (2005) rapporterte fravær av *luxA* genet i *P. iliopiscarium* stammer ble det i denne studien observert bioluminescens hos 5 av 29 *P. iliopiscarium* stammer. Slik som for de andre indikerer dette variasjon mellom stammenes evne til å generere bioluminescens og at dette kan være påvirket av temperaturer eller saltkonsentrasjoner.

6 Konklusjon

Denne studien vurderte identifisering og karakterisering av 54 *Photobacterium* stammer isolert fra rødspette lagret på is (0 °C) i luft, i MAP (70 % CO₂, 20 % N₂, 10 % O₂) ved 4 °C og i vakuum ved 4 °C og fra ulike sesonger (april og september). Ved gjennomføring av genotypiske metoder ble stammene artsidentifisert som *P. iliopiscarium*, *P. phosphoreum* og *P. piscicola* basert på sekvensering av tre husholdningsgener (*gyrB*, *gapA* og *recA*). Sekvensering av 16S rRNA genotyper ga ulik identifisering for 63 % av stammene og indikerte dermed lavere identifikasjonspotensial sammenlignet med sekvensering av husholdningsgenene. Vekstkinetikk parametere indikerte lite artsbasert variasjon i vekst ved ulike temperaturer (4-16 °C) og saltkonsentrasjoner (0-6 % NaCl) mellom to stammer av henholdsvis *P. iliopiscarium*, *P. phosphoreum* og *P. piscicola*. Analysering av vekstkinetikk parametere til flere stammer bør gjennomføres for å kontrollere disse resultatene.

Screeningsresultatene viste at de fleste stammene var i stand til å vokse ved kjøletemperatur (4 °C) i kombinasjon med 0, 1 og 3 % NaCl, og at de fleste stammene hadde mer vekst ved 1 % NaCl. Fullstendig hemmet vekst ble observert for de fleste stammene ved 6 % NaCl og 4 °C, og hos noen stammer ved 15 °C. Videre viste vekstkinetikk parametere til de seks utvalgte *Photobacterium* stammene at 4 °C i kombinasjon med 1 % NaCl ga ca. 2/3 lavere veksthastighet sammenlignet med 8 °C. Inkubering av alle 54 stammene med 100 % CO₂ og 1 % NaCl i kombinasjon med kjøletemperatur (4 °C), hadde en betydelig mer hemmende effekt sammenlignet med inkubering i luft. Samtidig var disse miljøforholdene ikke tilstrekkelig til å oppnå en fullstendig hemmende effekt, noe som indikerer vekstpotensialet til *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* og *P. piscicola* i kjølelagrede, MA-pakkete rødspette produkter. Flere barrierer kan derfor være nødvendig for å oppnå en utvidet holdbarhetstid. Inokulering direkte i rødspette bør gjennomføres for å støtte disse resultatene.

Et økt vekstpotensial ble observert hos stammer isolert i april sammenlignet med stammer isolert i september ved inkubering med ulike temperaturer, men ikke ulike saltkonsentrasjoner. Ytterligere forsøk for å kartlegge mulig sesongbasert variasjon er derfor nødvendig. Videre vistes det relative lite variasjon i stammenes gjennomsnittlige vekst basert på de tre ulike isolasjonsatmosfærene.

7 Forslag til videre arbeid

De 54 *Photobacterium* stammene som ble brukt i denne studien var i stand til å vokse ved miljøforhold (CO₂, 4 °C, 0 og 1 % NaCl) som er aktuelle prosessfaktorer for lett prosessert rødspette. For å kontrollere stammenes vekst i produkter bør videre studier inkludere inokulering av stammene direkte i rødspette. Ettersom inkubering med CO₂ hadde en mer hemmende effekt sammenlignet med luft, kan det i tillegg være aktuelt å utføre vekstkinetikk- eller inokuleringsforsøk med CO₂ i kombinasjon med andre milde inhiberingsmetoder som superkjøling (≤ -2 °C) eller biokonservering med tilsetning av melkesyrebakterier. I tillegg kan det være aktuelt å undersøke stammenes vekstpotensial ved lavere temperaturer enn 4 °C.

Sekvenseringsanalyse av *gyrB*, *gapA* og *recA* resulterte i vellykket klassifisering av de 54 *Photobacterium* stammene på artsnivå. Imidlertid inkluderer multilokus sekvensanalyse ofte opptil syv gener, slik at inkludering av flere husholdningsgener (f.eks. *pyrA luxA*, *pyrH*, *ftsZ*, *topA*, *mreB*, *rpoA*) i videre analyser kan være egnet for å kontrollere artsklassifiseringen. I tillegg kan konstruering av fylogenetiske trær ved bruk av maximum likelihood metoden benyttes for å oppnå høyere nøyaktighet i artsbasert gruppering av stammene.

Vekstkinetikk parametere indikerte lite artsbasert variasjon i vekst mellom *P. phosphoreum*, *P. iliopiscarium* og *P. piscicola* stammer. Imidlertid ble kun to stammer av hver art inkludert, slik at vekstkinetikk studier med flere stammer av hver art er nødvendig for å kunne bekrefte resultatene. Dette også i sammenheng med at andre studier har dokumentert variasjon mellom disse tre artene. Ettersom resultatene indikerte variasjon på stammenivå, ville det også vært aktuelt å utføre vekstkinetikk forsøk med alle de 54 stammene for å undersøke forskjeller i toleransen til aktuelle prosessfaktorer (temperatur, salt og CO₂) og for å kunne bekrefte variasjon i vekst knyttet til isolasjonskilder (sesong og atmosfære).

Referanseliste

- Abel, N., Rotabakk, B. T., & Lerfall, J. (2022). Mild processing of seafood—A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 21(1), 340-370.
<https://ift.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1541-4337.12876>
- Adhikari, S., Deb, U., Dey, M. M., Xie, L., Khanal, N. B., Grimm, C. C., Bland, J. M., & Bechtel, P. J. (2021). Consumers' willingness-to-pay for convenient catfish products: Results from experimental auctions in Arkansas. *Aquaculture Economics & Management*, 25(2), 135-158.
<https://doi.org/10.1080/13657305.2020.1840663>
- Altieri, C., Speranza, B., Del Nobile, M. A., & Sinigaglia, M. (2005). Suitability of bifidobacteria and thymol as biopreservatives in extending the shelf life of fresh packed plaice fillets. *J Appl Microbiol*, 99(6), 1294-1302.
- Anagnostopoulos, D. A., Parlapani, F. F., & Boziaris, I. S. (2022). The evolution of knowledge on seafood spoilage microbiota from the 20th to the 21st century: Have we finished or just begun? *Trends in Food Science & Technology*, 120, 236-247.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224422000048>
- Asioli, D., Aschemann-Witzel, J., Caputo, V., Vecchio, R., Annunziata, A., Næs, T., & Varela, P. (2017). Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Research International*, 99, 58-71.
- Ast, J. C., Cleenwerck, I., Engelbeen, K., Urbanczyk, H., Thompson, F. L., De Vos, P., & Dunlap, P. V. (2007). *Photobacterium kishitanii* sp. nov., a luminous marine bacterium symbiotic with deep-sea fishes. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 9), 2073-2078.
- Ast, J. C., & Dunlap, P. V. (2004). Phylogenetic analysis of the lux operon distinguishes two evolutionarily distinct clades of *Photobacterium leiognathi*. *Archives of microbiology*, 181(5), 352--361.
- Ast, J. C., & Dunlap, P. V. (2005). Phylogenetic resolution and habitat specificity of members of the *Photobacterium phosphoreum* species group. *Environmental microbiology*, 7(10), 1641-1654. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1462-2920.2005.00859.x>
- Baranyi, J., & Roberts, T. A. (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3-4), 277-294.
- Bartlett, D. H., & Welch, T. J. (1995). ompH gene expression is regulated by multiple environmental cues in addition to high pressure in the deep-sea bacterium *Photobacterium* species strain SS9. *Journal of bacteriology*, 177(4), 1008-1016.
- Bjornsdottir-Butler, K., Abraham, A., Harper, A., Dunlap, P. V., & Benner, J. R. A. (2018). Biogenic Amine Production by and Phylogenetic Analysis of 23 *Photobacterium* Species. 81(8), 1264--1274.
- Bjornsdottir-Butler, K., McCarthy, S. A., Dunlap, P. V., Benner, R. A., & Besser, T. E. (2016). *Photobacterium angustum* and *Photobacterium kishitanii*, Psychrotrophic High-Level Histamine-Producing Bacteria Indigenous to Tuna. *Applied and environmental microbiology*, 82(7), 2167-2176. <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/AEM.02833-15>
- Boisvert, H., Chatelain, R., & Bassot, J.-M. (1967). Étude d'un *Photobacterium* isolé de l'organe lumineux des poissons Leiognathidae. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 112, 520-524.
- Boziaris, I. S. (2014). *Seafood processing : technology, quality and safety*. John Wiley & Sons Inc.
- Boziaris, I. S., & Parlapani, F. F. (2017). Chapter 3 - Specific Spoilage Organisms (SSOs) in Fish. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *The Microbiological Quality of Food* (pp. 61-98). Woodhead Publishing.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005026000066>

- Brenner, D. J., Boone, D. R., Garrity, G. M., Goodfellow, M., Krieg, N. R., Rainey, F. A., Schleifer, K.-H., Staley, J. T., & Vos, P. (2005). *The Proteobacteria: Part B: the Gammaproteobacteria*. Springer New York.
- Budsberg, K., Wimpee, C., & Braddock, J. (2003). Isolation and identification of *Photobacterium phosphoreum* from an unexpected niche: migrating salmon. *Applied and environmental microbiology*, *69*(11), 6938-6942.
- Carlucci, D., Nocella, G., De Devitiis, B., Viscecchia, R., Bimbo, F., & Nardone, G. (2015). Consumer purchasing behaviour towards fish and seafood products. Patterns and insights from a sample of international studies. *Appetite*, *84*, 212-227.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195666314004887>
- Chimetto, L. A., Cleenwerck, I., Thompson, C. C., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P., & Thompson, F. L. (2010). *Photobacterium jeanii* sp. nov., isolated from corals and zoanthids. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(12), 2843-2848.
- Comi, G. (2017). Chapter 8 - Spoilage of Meat and Fish. In A. Bevilacqua, M. R. Corbo, & M. Sinigaglia (Eds.), *The Microbiological Quality of Food* (pp. 179-210). Woodhead Publishing.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100502-6.00011-X>
- Cortesi, M. L., Panebianco, A., Giuffrida, A., & Anastasio, A. (2009). Innovations in seafood preservation and storage. *Veterinary research communications*, *33 Suppl 1*(S1), 15--23.
- Dahl, L., Edel Erdal, Kristoffersen, M. E., Kjellevold, M., (Havforskningsinstituttet), Ellen Kielland (Mattilsynet), Aarum, A. K. O., & (Helsedirektoratet), B. L. (2019). ANALYSER AV SALTINNHOLD I UTVALGTE MATVARER I NORGE 2014-2018.
- Dalgaard, P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *International Journal of Food Microbiology*, *26*(3), 319-333.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00137-U](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00137-U)
- Dalgaard, P. (2003). Spoilage of seafood. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*, 2462-2472.
<https://doi.org/10.1016/B0-12-227055-X/00476-4>
- Dalgaard, P. (2005). Microbiology of Marine Muscle Foods. In. <https://doi.org/10.1201/b15995-58>
- Dalgaard, P., Gram, L., & Huss, H. H. (1993). Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *19*(4), 283--294.
- Dalgaard, P., Madsen, H. L., Samieian, N., & Emborg, J. (2006). Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*) – effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. *Journal of Applied Microbiology*, *101*(1), 80-95.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02905.x>
- Dalgaard, P., Manfio, G. P., & Goodfellow, M. (1997). Classification of *Photobacteria* Associated with Spoilage of Fish Products by Numerical Taxonomy and Pyrolysis Mass Spectrometry. *Zentralblatt für Bakteriologie*, *285*(2), 157-168.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0934-8840\(97\)80024-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0934-8840(97)80024-2)
- Deep, K., Poddar, A., & Das, S. K. (2014). *Photobacterium panuliri* sp. nov., an Alkalitolerant Marine Bacterium Isolated from Eggs of Spiny Lobster, *Panulirus penicillatus* from Andaman Sea. *Current Microbiology*, *69*(5), 660-668. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0638-0>
- DeLong, E. F., Franks, D. G., & Yayanos, A. A. (1997). Evolutionary relationships of cultivated psychrophilic and barophilic deep-sea bacteria. *Applied and environmental microbiology*, *63*(5), 2105-2108.
- Dunlap, P. V., Kojima, Y., Nakamura, S., & Nakamura, M. (2009). Inception of formation and early morphogenesis of the bacterial light organ of the sea urchin cardinalfish, *Siphamia versicolor*. *Marine biology*, *156*(10), 2011-2020.
- EC, J. R. C., Scientific, Technical and Economic Committee for Fisheries (2020). The 2020 annual economic report on the EU fishing fleet (STECF 20-06)
<https://doi.org/https://stecf.jrc.ec.europa.eu/documents/43805/2709604/STECF+20-06+-+AER+2020.pdf/0568293a-9b8a-4baa-b4dd-c4f40c8aeb26>
- Emborg, J., Laursen, B. G., & Dalgaard, P. (2005). Significant histamine formation in tuna (*Thunnus albacares*) at 2 °C—effect of vacuum- and modified atmosphere-packaging on

- psychrotolerant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 101(3), 263-279. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.12.001>
- Emborg, J., Laursen, B. G., Rathjen, T., & Dalgaard, P. (2002). Microbial spoilage and formation of biogenic amines in fresh and thawed modified atmosphere-packed salmon (*Salmo salar*) at 2 degrees C. *J Appl Microbiol*, 92(4), 790-799. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01588.x>
- Eurofins Genomics. (2022). Sample Submission Guide for theLightRun Tube Sequencing Service. https://eurofinsgenomics.eu/media/1611196/eurofins-flyer-samplesubmission-lightrun-tube_20210322_online.pdf
- Farmer, J. J., & Hickman-Brenner, F. W. (2006). The Genera *Vibrio* and *Photobacterium*. In (Vol. 2, pp. 508-563). https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_18
- Fernández, K., Aspe, E., & Roeckel, M. (2009). Shelf-life extension on fillets of Atlantic Salmon (*Salmo salar*) using natural additives, superchilling and modified atmosphere packaging. 20(11), 1036--1042.
- Figge, M. J., Cleenwerck, I., van Uijen, A., De Vos, P., Huys, G., & Robertson, L. (2014). *Photobacterium piscicola* sp. nov., isolated from marine fish and spoiled packed cod. *Systematic and Applied Microbiology*, 37(5), 329-335. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.05.003>
- Fiskedirektoratet. (2021). Rundvekt (tonn) fordelt på art og redskap. <https://www.fiskeridir.no/Yrkesfiske/Tall-og-analyse/Fangst-og-kvoter/Fangst/Fangst-fordelt-paa-art>
- Flodgaard, L., Dalgaard, P., Andersen, J. B., Nielsen, K. F., Givskov, M., & Gram, L. (2005). Nonbioluminescent strains of *Photobacterium phosphoreum* produce the cell-to-cell communication signal N-(3-hydroxyoctanoyl) homoserine lactone. *Applied and environmental microbiology*, 71(4), 2113-2120.
- Frank, D., Lieve, V., & Johan, D. (2004). New preservation technologies: Possibilities and limitations. *International Dairy Journal*, 14(4), 273-285. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.07.002>
- Fuertes-Perez, S., Hauschild, P., Hilgarth, M., & Vogel, R. F. (2019). Biodiversity of *Photobacterium* spp. Isolated From Meats. 10, 2399--2399.
- Fukasawa, S., & Dunlap, P. V. (1986). Identification of luminous bacteria isolated from the light organ of the squid, *Doryteuthis kensaki*. *Agricultural and biological chemistry*, 50(6), 1645-1646.
- Gauthier, G., Lafay, B., Ruimy, R., Breittmayer, V., Nicolas, J.-L., Gauthier, M., & Christen, R. (1995). Small-Subunit rRNA Sequences and Whole DNA Relatedness Concur for the Reassignment of *Pasteurella piscicida* (Snieszko et al.) Janssen and Surgalla to the Genus *Photobacterium* as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 45(1), 139-144.
- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J., Stackebrandt, E., de Peer, Y. V., Vandamme, P., & Thompson, F. L. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nature reviews microbiology*, 3(9), 733-739.
- Ghaly, A., Dave, D., S, B., & Brooks, M. (2010). Fish Spoilage Mechanisms and Preservation Techniques: Review. *American Journal of Applied Sciences*, 7.
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Rotllant, G., Peinado, L., Romalde, J. L., Doce, A., Cabanillas-Beltrán, H., Chimento, L. A., & Thompson, F. L. (2011). *Photobacterium swingsii* sp. nov., isolated from marine organisms. *Int J Syst Evol Microbiol*, 61(Pt 2), 315-319. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.019687-0>
- Gomez-Gil, B., Roque, A., Rotllant, G., Romalde, J. L., Doce, A., Eggermont, M., & Defoirdt, T. (2016). *Photobacterium sanguinancris* sp. nov. isolated from marine animals. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 109(6), 817-825. <https://doi.org/10.1007/s10482-016-0681-x>
- Gonçalves, A. A., Kechinski, C., & Cladera-Olivera, F. (2011). Hurdle technology in the food industry. In (pp. 147-210).

- Gram, L. (2009). Microbiological Spoilage of Fish and Seafood Products. *Food Microbiology and Food Safety*, 87--119.
- Gram, L., & Dalgaard, P. (2002). Fish spoilage bacteria - Problems and solutions. *Current opinion in biotechnology*, 13, 262-266. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00309-9](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00309-9)
- Gram, L., & Huss, H. H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. 33(1), 121--137.
- Gram, L., & Huss, H. H. (2000). Fresh and processed fish and shellfish. *Themicrobiological Safety and Quality of Food*, 1, 472-506.
- Grigorakis, K., Taylor, K. D. A., & Alexis, M. N. (2003). Seasonal patterns of spoilage of ice-stored cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Food Chemistry*, 81(2), 263-268. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00421-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00421-1)
- Gökoğlu, N., & Yerlikaya, P. n. (2015). Quality changes of fish during chilling. In *Seafood Chilling, Refrigeration and Freezing* (pp. 113-127). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9781118512210.ch5>
- Hansen, A., Mørkøre, T., Rudi, K., Olsen, E., & Eie, T. (2007). Quality changes during refrigerated storage of MA-packaged pre-rigor fillets of farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) using traditional MAP, CO2 emitter, and vacuum. *Journal of food science*, 72(9), M423-M430.
- Hao, R., Roy, K., Pan, J., Shah, B. R., & Mraz, J. (2021). Critical review on the use of essential oils against spoilage in chilled stored fish: A quantitative meta-analyses. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 175-190. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.054>
- Havforskningsinstituttet. (2020). Monitoring bycatches in norwegian fisheries. <https://www.hi.no/templates/reporteditor/report-pdf?id=31549&29113313>
- Helsedirektoratet. (2019). Saltpartnerskapet 2015-2018 - Fremdrift og måloppnåelse. https://www.helsedirektoratet.no/rapporter/saltpartnerskapet-2015-2018-fremdrift-og-maloppnaelse/vedlegg-og-pdf-versjon-av-rapporten/Saltpartnerskapet%202015%E2%80%932018%E2%80%9320Fremdrift%20og%20m%C3%A5loppn%C3%A5else.pdf/_attachment/inline/Of575b28-c390-4647-9dd6-2fae4c8fe2e9:ab4430b19d24222ace2887b1250121640bbe59dd/Saltpartnerskapet%202015%E2%80%932018%E2%80%9320Fremdrift%20og%20m%C3%A5loppn%C3%A5else.pdf
- Hendrie, M. S., Hodgkiss, W., & Shewan, J. M. (1970). The identification, taxonomy and classification of luminous bacteria. *Microbiology*, 64(2), 151-169.
- Henriksen, E. (2011). Høstfiske og restkvoter. <https://torskeprogrammet.no/wp-content/uploads/sites/16/2014/03/H%C3%B8stfiske-og-restkvoter.pdf>
- Hovda, M. B., Sivertsvik, M., Lunestad, B. T., Lorentzen, G., & Rosnes, J. T. (2007). Characterisation of the dominant bacterial population in modified atmosphere packaged farmed halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) based on 16S rDNA-DGGE. *Food Microbiology*, 24(4), 362-371.
- Hozbor, M., Saiz, A., Yeannes, M., & Fritz, R. (2006). Microbiological changes and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudopercis semifasciata*). *LWT-Food Science and Technology*, 39(2), 99-104.
- Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish* (Vol. 348). FAO.
- Huss, H. H., Reilly, A., & Karim Ben Embarek, P. (2000). Prevention and control of hazards in seafood. *Food control*, 11(2), 149--156.
- IMR. (2020). Fremmedstoffer i rødspette, breiflabb og lyr — Sluttrapport for kartleggingsprogrammet «Fremmedstoffer i villfisk med vekt på kystnære farvann» 2016-2018. <https://www.hi.no/en/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-2020-20?fbclid=IwAR0hOugCHw01RDUnuCbRHM7jks6LLsAf9C2O6xyQb9Q-cYJDOvmXynXh38>
- International Council for the Exploration of the Sea. (2020). *Plaice in Subarea 4 (North Sea) and Subdivision 20 (Skagerrak)*. https://www.ices.dk/sites/pub/Publication%20Reports/Expert%20Group%20Report/Fisheries%20Resources%20Steering%20Group/2020/WGNSSK_publication%20with%20multiple%20files/WGNSSK2020_13%20Plaice%20in%20Subarea%204%20and%20Subdivision%2020.pdf
- Ivanova, E. P., Flavier, S., & Christen, R. (2004). Phylogenetic relationships among marine Alteromonas-like proteobacteria: emended description of the family Alteromonadaceae and

- proposal of Pseudoalteromonadaceae fam. nov., Colwelliaceae fam. nov., Shewanellaceae fam. nov., Moritellaceae fam. nov., Ferrimonadaceae fam. nov., Idiomarinaceae fam. nov. and Psychromonadaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(5), 1773-1788.
- Janda, J. M., & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory : Pluses, perils, and pitfalls. *Journal of clinical microbiology*, 45(9), 2761-2764.
- Johnsen, O. (2000). Lite utnyttede ressurser : en litteraturgjennomgang av potensielle arter. In *Rapport (Fiskeriforskning : trykt utg.)* (Vol. 10/2000).
- Jung, S.-Y., Jung, Y.-T., Oh, T.-K., & Yoon, J.-H. (2007). Photobacterium lutimaris sp. nov., isolated from a tidal flat sediment in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(2), 332-336.
- Kaeding, A. J., Ast, J. C., Pearce, M. M., Urbanczyk, H., Kimura, S., Endo, H., Nakamura, M., & Dunlap, P. V. (2007). Phylogenetic diversity and cosymbiosis in the bioluminescent symbioses of "Photobacterium mandapamensis". *Applied and environmental microbiology*, 73(10), 3173-3182.
- Kanki, M., Yoda, T., Tsukamoto, T., & Baba, E. (2007). Histidine Decarboxylases and Their Role in Accumulation of Histamine in Tuna and Dried Saury. *Applied and environmental microbiology*, 73, 1467-1473. <https://doi.org/10.1128/AEM.01907-06>
- Kim, M.-J., Hirono, I., Kurokawa, K., Maki, T., Hawke, J., Kondo, H., Santos, M. D., & Aoki, T. (2008). Complete DNA sequence and analysis of the transferable multiple-drug resistance plasmids (R plasmids) from Photobacterium damsela subsp. piscicida isolates collected in Japan and the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(2), 606-611.
- Kimura, B., Hokimoto, S., Takahashi, H., & Fujii, T. (2000). Photobacterium histaminum Okuzumi et al. 1994 is a later subjective synonym of Photobacterium damsela subsp. damsela (Love et al. 1981) Smith et al. 1991. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(3), 1339-1342.
- Koutsoumanis, K., & Nychas, G.-J. E. (1999). Chemical and sensory changes associated with microbial flora of Mediterranean boque (Boops boops) stored aerobically at 0, 3, 7, and 10 C. *Applied and environmental microbiology*, 65(2), 698-706.
- Koutsoumanis, K. P., Taoukis, P. S., Drosinos, E. H., & Nychas, G.-J. E. (2000). Applicability of an Arrhenius model for the combined effect of temperature and CO2 packaging on the spoilage microflora of fish. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3528-3534.
- Kuts, V. V., & Ismailov, A. D. (2009). Physiological and emission characteristics of the luminescent bacterium Photobacterium Phosphoreum from the White Sea. *Microbiology*, 78(5), 554. <https://doi.org/10.1134/S002626170905004X>
- Labella, A. M., Arahall, D. R., Castro, D., Lemos, M. L., & Borrego, J. J. (2017). Revisiting the genus Photobacterium: taxonomy, ecology and pathogenesis. *20(1)*, 1--10.
- Labella, A. M., Castro, M. D., Machado, M., & Borrego, J. J. (2018). Description of new and amended clades of the genus photobacterium. *Microorganisms*, 6(1), 24.
- Labella, A. M., Castro, M. D., Machado, M., Lucena, T., Arahall, D. R., & Borrego, J. J. (2018). Photobacterium malacitanum sp. nov., and Photobacterium andalusiense sp. nov., two new bacteria isolated from diseased farmed fish in Southern Spain. *41(5)*, 444--451.
- Lacroix, C. (2010). *Protective Cultures, Antimicrobial Metabolites and Bacteriophages for Food and Beverage Biopreservation*.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1-3), 181-186.
- Lerfall, J., Bjørge Thomassen, G. M., & Jakobsen, A. N. (2018). Quality of fresh saithe (Pollachius virens) in modified atmosphere packages as affected by the gas composition. *Food Packaging and Shelf Life*, 18, 147-156. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2018.11.006>

- Lerfall, J., Shumilina, E., & Jakobsen, A. N. (2022). The significance of *Shewanella* sp. strain HSO12, *Photobacterium phosphoreum* strain HS254 and packaging gas composition in quality deterioration of fresh saithe fillets. *LWT*, *154*, 112636.
- Leroi, F. (2014). Role of Bacteria in Seafood Products. In (pp. 458-482).
<https://doi.org/10.1201/b17402-21>
- Liu, Y., Liu, L. Z., Song, L., Zhou, Y. G., Qi, F. J., & Liu, Z. P. (2014). *Photobacterium aquae* sp. nov., isolated from a recirculating mariculture system. *Int J Syst Evol Microbiol*, *64*(Pt 2), 475-480.
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.055020-0>
- Lovdal, T. (2015). The microbiology of cold smoked salmon. *Food control*, *54*, 360--373.
- Macé, S., Cornet, J., Chevalier, F., Cardinal, M., Pilet, M.-F., Dousset, X., & Joffraud, J.-J. (2012). Characterisation of the spoilage microbiota in raw salmon (*Salmo salar*) steaks stored under vacuum or modified atmosphere packaging combining conventional methods and PCR–TTGE. *Food Microbiology*, *30*(1), 164-172. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.10.013>
- Macé, S., Joffraud, J.-J., Cardinal, M., Malcheva, M., Cornet, J., Lalanne, V., Chevalier, F., Sérot, T., Pilet, M.-F., & Dousset, X. (2013). Evaluation of the spoilage potential of bacteria isolated from spoiled raw salmon (*Salmo salar*) fillets stored under modified atmosphere packaging. *International Journal of Food Microbiology*, *160*(3), 227-238.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.10.013>
- Machado, H., Giubergia, S., Mateiu, R. V., & Gram, L. (2015). *Photobacterium galathea* sp. nov., a bioactive bacterium isolated from a mussel in the Solomon Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*, *65*(12), 4503-4507. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000603>
- Madsen, N., Feekings, J., & Lewy, P. (2013). Discarding of plaice (*Pleuronectes platessa*) in the Danish North Sea trawl fishery. *Journal of sea research*, *75*, 129-134.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.seares.2012.05.005>
- Makiguchi, N., ARITA, M., & ASAI, Y. (1980). Optimum cultural conditions for strong light production by *Photobacterium phosphoreum*. *The Journal of General and Applied Microbiology*, *26*(2), 75-84.
- Maria, K., Vasiliki, G., Ioannis, N. S., & Michael, G. K. (2009). Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology*, *26*(5), 475-482.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2009.02.008>
- Mathew, D. C., Ho, Y.-N., Gicana, R. G., Mathew, G. M., Chien, M.-C., & Huang, C.-C. (2015). A rhizosphere-associated symbiont, *Photobacterium* spp. strain MELD1, and its targeted synergistic activity for phytoprotection against mercury. *PLoS One*, *10*(3), e0121178--e0121178.
- Misund, B., Petter Osmundsen, Ragnar Tveterås, Benn Folkvord, Ragnar Nystøyl, & Rolland, K. H. (2020). Grunnrenteskatt i havbruk – Et kunnskapsgrunnlag
- Faglig sluttrapport. <https://ebooks.uis.no/index.php/USPS/catalog/view/46/44/191-1>
- Mohanty, B. P., Mahanty, A., Ganguly, S., Mitra, T., Karunakaran, D., & Anandan, R. (2019). Nutritional composition of food fishes and their importance in providing food and nutritional security. *Food Chemistry*, *293*, 561-570.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.039>
- Moi, I. M., Roslan, N. N., Leow, A. T. C., Ali, M. S. M., Rahman, R. N. Z. R. A., Rahimpour, A., & Sabri, S. (2017). The biology and the importance of *Photobacterium* species. *Applied microbiology and biotechnology*, *101*(11), 4371-4385.
- Moreira, A. P. B., Duytschaever, G., Chimetto Tonon, L. A., Fróes, A. M., de Oliveira, L. S., Amado-Filho, G. M., Francini-Filho, R. B., De Vos, P., Swings, J., Thompson, C. C., & Thompson, F. L. (2014). *Photobacterium sanctipauli* sp. nov. isolated from bleached *Madracis decactis* (Scleractinia) in the St Peter & St Paul Archipelago, Mid-Atlantic Ridge, Brazil. *PeerJ*, *2*, e427-e427. <https://doi.org/10.7717/peerj.427>

- Mueller Loose, S., Peschel, A., & Grebitus, C. (2013). Quantifying effects of convenience and product packaging on consumer preferences and market share of seafood products: The case of oysters. *Food Quality and Preference*, 28(2), 492-504.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2012.11.004>
- National Center for Biotechnology Information. (2021).
https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=&LINK_LOC=blasttab&LAST_PAGE=blastx
- Nielsen, T., Mihnea, M., Båth, K., Cunha, S. C., Ferreira, R., Fernandes, J. O., Gonçalves, A., Nunes, M. L., & Oliveira, H. (2020). New formulation for producing salmon pâté with reduced sodium content. *Food Chem Toxicol*, 143, 111546. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111546>
- Nieminen, T. T., Dalgaard, P., & Björkroth, J. (2016). Volatile organic compounds and Photobacterium phosphoreum associated with spoilage of modified-atmosphere-packaged raw pork. *International Journal of Food Microbiology*, 218, 86-95.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.11.003>
- Nogi, Y., Masui, N., & Kato, C. (1998). Photobacterium profundum sp. nov., a new, moderately barophilic bacterial species isolated from a deep-sea sediment. *Extremophiles*, 2(1), 1-7.
<https://doi.org/10.1007/s007920050036>
- Norges Sjømatråd. (2022). Sjømateksporten passerte 120 milliarder kroner i fjor.
<https://seafood.no/aktuelt/nyheter/sjomateksporten-passerte-120-milliarder-kroner-i-fjor/>
- Nygaard, R. M. (2017). Bruk av massiv parallell sekvensering for påvisning og identifikasjon av mikrober i galle hos pasienter med akutt kolangitt. In.
- Oddrun, B., & Edgar, H. (2011). Anbefalinger for videre satsing på LUR-arter.
<https://nofima.brage.unit.no/nofima-xmlui/bitstream/handle/11250/2504578/Rapport%2b39-2011.pdf?sequence=2&isAllowed=y>
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 311-331.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>
- Ojha, K. K., Mishra, S., & Singh, V. K. (2022). Chapter 5 - Computational molecular phylogeny: concepts and applications. In D. B. Singh & R. K. Pathak (Eds.), *Bioinformatics* (pp. 67-89). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-89775-4.00025-0>
- Olafsdottir, G., Lauzon, H. L., Martinsdottir, E., & Kristbergsson, K. (2006). Influence of storage temperature on microbial spoilage characteristics of haddock fillets (*Melanogrammus aeglefinus*) evaluated by multivariate quality prediction. *International Journal of Food Microbiology*, 111(2), 112-125.
- Onarheim, A. M., Wiik, R., Burghardt, J., & Stackebrandt, E. (1994). Characterization and identification of two *Vibrio* species indigenous to the intestine of fish in cold sea water; description of *Vibrio iliopiscarius* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology*, 17(3), 370-379.
- Pal, J., Ravi, O., Kumari, S., & Singh, A. (2021). Preservation of Seafoods by Hurdle Technology. In.
<https://doi.org/10.5772/intechopen.95900>
- Park, Y.-D., Baik, K. S., Seong, C. N., Bae, K. S., Kim, S., & Chun, J. (2006). Photobacterium ganghwense sp. nov., a halophilic bacterium isolated from sea water. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(4), 745-749.
- Parlapani, F. F., Kormas, K. A., & Boziaris, I. S. (2015). Microbiological changes, shelf life and identification of initial and spoilage microbiota of sea bream fillets stored under various conditions using 16S rRNA gene analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(12), 2386-2394.
- Parte, A. C. (2014). LPSN--list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue), D613-D616. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1111>
- Pereira de Abreu, D. A., Losada, P. P., Maroto, J., & Cruz, J. M. (2010). Evaluation of the effectiveness of a new active packaging film containing natural antioxidants (from barley husks) that retard

- lipid damage in frozen Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Food Research International*, 43(5), 1277-1282. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.03.019>
- qiagen. (2010). Protocol: PCR using HotStarTaq *Plus* Polymerase.
- Reichelt, J. L., Baumann, P., & Baumann, L. (1976). Study of genetic relationships among marine species of the genera *Beneckea* and *Photobacterium* by means of in vitro DNA/DNA hybridization. *Archives of microbiology*, 110(1), 101-120.
- Reynisson, E., Lauzon, H. L., Magnússon, H., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Marteinson, V., Hreggvidsson, & Oli, G. (2009). Bacterial composition and succession during storage of North-Atlantic cod (*Gadus morhua*) at superchilled temperatures. 9(1), 250--250.
- Reynisson, E., Lauzon, H. L., Magnússon, H., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G., Marteinson, V., & Hreggviðsson, G. Ó. (2009). Bacterial composition and succession during storage of North-Atlantic cod (*Gadus morhua*) at superchilled temperatures. *BMC Microbiology*, 9(1), 250. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-250>
- Rivas, R., García-Fraile, P., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E., & Velazquez, E. (2006). *Photobacterium halotolerans* sp. nov., isolated from Lake Martel in Spain. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(5), 1067-1071.
- Robson, A. A., Kelly, M. S., & Latchford, J. W. (2007). Effect of temperature on the spoilage rate of whole, unprocessed crabs: *Carcinus maenas*, *Necora puber* and *Cancer pagurus*. *Food Microbiology*, 24(4), 419-424. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.016>
- Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S. E., & Nissen, H. (2004). Explorative multivariate analyses of 16S rRNA gene data from microbial communities in modified-atmosphere-packed salmon and coalfish. *Appl Environ Microbiol*, 70(8), 5010-5018. <https://doi.org/10.1128/aem.70.8.5010-5018.2004>
- Ruimy, R., Breittmayer, V., Elbaze, P., Lafay, B., Boussemart, O., Gauthier, M., & Christen, R. (1994). Phylogenetic analysis and assessment of the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Aeromonas*, and *Plesiomonas* deduced from small-subunit rRNA sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 44(3), 416-426.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Seo, H. J., Bae, S. S., Lee, J.-H., & Kim, S.-J. (2005). *Photobacterium frigidiphilum* sp. nov., a psychrophilic, lipolytic bacterium isolated from deep-sea sediments of Edison Seamount. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1661-1666.
- Šimat, V., & Mekinić, I. G. (2019). Advances in Chilling. In *Innovative Technologies in Seafood Processing* (pp. 1-25). CRC Press.
- Sivertsvik, M. (2007). The optimized modified atmosphere for packaging of pre-rigor filleted farmed cod (*Gadus morhua*) is 63ml/100ml oxygen and 37ml/100ml carbon dioxide. *LWT - Food Science and Technology*, 40(3), 430-438. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2005.12.010>
- Sivertsvik, M., Jeksrud, W. K., & Rosnes, J. T. (2002). A review of modified atmosphere packaging of fish and fishery products - significance of microbial growth, activities and safety. 37(2), 107--127.
- Sivertsvik, M., Rosnes, J., & Kleiberg, G. (2003). Effect of modified atmosphere packaging and superchilled storage on the microbial and sensory quality of Atlantic salmon (*Salmo salar*) fillets. *Journal of food science*, 68(4), 1467-1472.
- Stamatakis, A., Ludwig, T., & Meier, H. (2005). RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 21(4), 456-463.
- Stoops, J., Ruyters, S., Busschaert, P., Spaepen, R., Verreth, C., Claes, J., Lievens, B., & Van Campenhout, L. (2015). Bacterial community dynamics during cold storage of minced meat packaged under modified atmosphere and supplemented with different preservatives. *Food Microbiology*, 48, 192-199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.12.012>
- Stringer, D. S. C., & Pin, a. D. C. (2005). Microbial risks associated with salt reduction in certain foods and alternative options for preservation.

https://acmsf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/acm740a.pdf

- Stupar, J., Holøymoen, I. G., Hoel, S., Lerfall, J., Rustad, T., & Jakobsen, A. N. (2021). Diversity and Antimicrobial Activity towards *Listeria* spp. and *Escherichia coli* among Lactic Acid Bacteria Isolated from Ready-to-Eat Seafood. *Foods*, *10*(2), 271.
- Svanevik, C. S., & Lunestad, B. T. (2011). Characterisation of the microbiota of Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). *International Journal of Food Microbiology*, *151*(2), 164-170.
- Sveinsdottir, K., Martinsdottir, E., Hyldig, G., Jørgensen, B., & Kristbergsson, K. (2002). Application of quality index method (QIM) scheme in shelf-life study of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of food science*, *67*(4), 1570-1579.
- Sørensen, J. S., Bøknæs, N., Mejlholm, O., & Dalgaard, P. (2020). Superchilling in combination with modified atmosphere packaging resulted in long shelf-life and limited microbial growth in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) from capture-based-aquaculture in Greenland. *Food Microbiology*, *88*, 103405. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103405>
- Thermo Scientific. (2015). Assessment of Nucleic Acid Purity. Article Technical Note 52646. <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
- Thompson, F., Thompson, C., Naser, S., Hoste, B., Vandemeulebroecke, K., Munn, C., Bourne, D., & Swings, J. (2005). *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio coralii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *55*(2), 913-917.
- Tindall, B. J., Rosselló-Móra, R., Busse, H.-J., Ludwig, W., & Kämpfer, P. (2010). Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *60*(1), 249-266. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.016949-0>
- Tryfinopoulou, P., Tsakalidou, E., & Nychas, G.-J. (2002). Characterization of *Pseudomonas* spp. associated with spoilage of gilt-head sea bream stored under various conditions. *Applied and environmental microbiology*, *68*(1), 65-72.
- Tsironi, T., Houhoula, D., & Taoukis, P. (2020). Hurdle technology for fish preservation. *Aquac Fish* 5: 65–71. In.
- Ufnal, M., Zadlo, A., & Ostaszewski, R. (2015). TMAO: A small molecule of great expectations. *Nutrition*, *31*(11), 1317-1323. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2015.05.006>
- Urakawa, H., Kita-Tsukamoto, K., & Ohwada, K. (1999). Reassessment of the taxonomic position of *Vibrio iliopiscarius* (Onarheim et al. 1994) and proposal for *Photobacterium iliopiscarium* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *49*(1), 257-260.
- Urbanczyk, H., Ast, J. C., & Dunlap, P. V. (2011). Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *FEMS Microbiol Rev*, *35*(2), 324-342. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x>
- Wada, M., Kamiya, A., Uchiyama, N., Yoshizawa, S., Kita-Tsukamoto, K., Ikejima, K., Yu, R., Imada, C., Karatani, H., & Mizuno, N. (2006). Lux A gene of light organ symbionts of the bioluminescent fish *Acropoma japonicum* (Acropomatidae) and *Siphamia versicolor* (Apogonidae) forms a lineage closely related to that of *Photobacterium leiognathi* ssp. *mandapamensis*. *FEMS microbiology letters*, *260*(2), 186-192.
- Watanabe, H., & Hastings, J. W. (2004). Expression of luminescence in *Photobacterium phosphoreum*: Na⁺ regulation of in vivo luminescence appearance. *Archives of microbiology*, *145*, 342-346.
- Waters, P., & Lloyd, D. (1985). Salt, pH and Temperature Dependencies of Growth and Bioluminescence of Three Species of Luminous Bacteria Analysed on Gradient Plates. *Microbiology*, *131*(11), 2865-2869. <https://doi.org/10.1099/00221287-131-11-2865>

- WHO. (2020). Salt reduction. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salt-reduction>
- Yoon, J.-H., Lee, J.-K., Kim, Y.-O., & Oh, T.-K. (2005). Photobacterium lipolyticum sp. nov., a bacterium with lipolytic activity isolated from the Yellow Sea in Korea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 335-339.
- Yoshizawa, S., Wada, M., Kita-Tsukamoto, K., Ikemoto, E., Yokota, A., & Kogure, K. (2009). Vibrio azureus sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(7), 1645-1649.
- Yu, D., Wu, L., Regenstein, J. M., Jiang, Q., Yang, F., Xu, Y., & Xia, W. (2020). Recent advances in quality retention of non-frozen fish and fishery products: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1747-1759. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1596067>

Vedlegg A

Long and Hammer agar

Oppskrift på Long and Hammer agar i henhold til NMKL No. 184 (NMKL, 2006).

Long and Hammer agar	g/l
Proteose – pepton no. 3	20
Gelatin	40
K ₂ HPO ₄	1
NaCl	10
Agar	15
Destillert vann	1000 ml
Fe(III)NH₄ Citrat-løsning	2,5 ml
Fe(III)NH ₄ Citrat	2,0
Destillert vann	20 ml

(Mediet avkjøles til 45 °C før Fe(III)NH₄ Citrat tilsettes).

Vedlegg B

Oversikt over referanse stammene

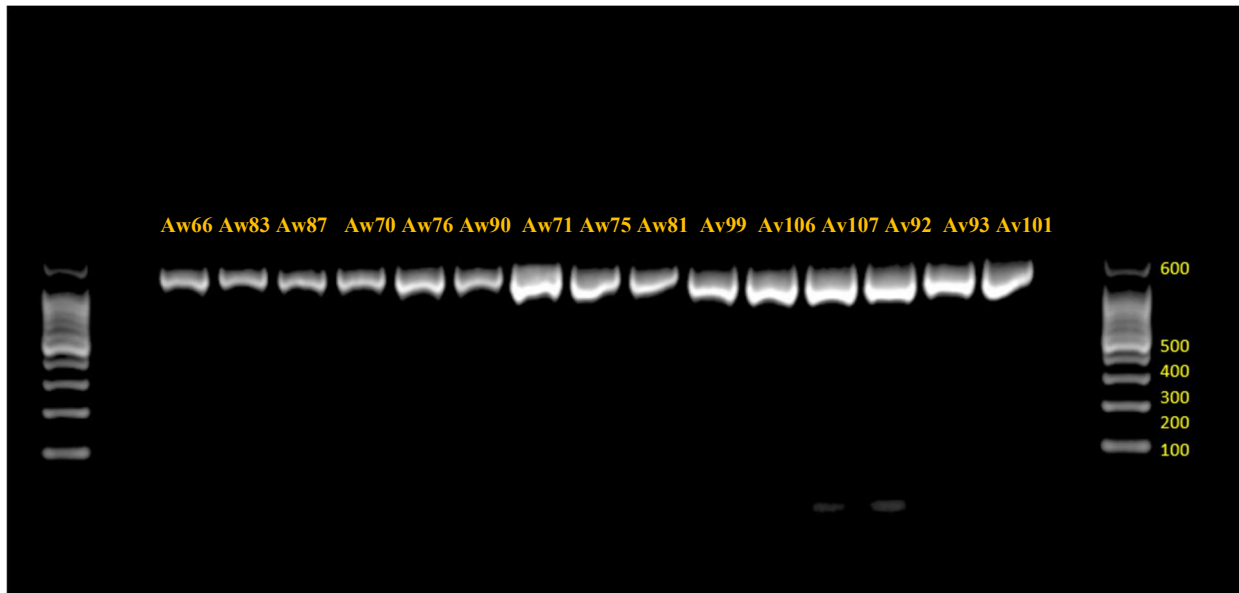
Oversikt over referanse stammene for *gyrB*, *gapA*, *recA* og 16S rRNA som ble lastet ned fra GenBank og inkludert i den fylogenetiske analysen.

<i>gyrB</i>	
<i>P. indicum</i>	Photobacterium indicum strain ATCC 19614 DNA gyrase beta subunit DEFINITION Photobacterium indicum strain ATCC 19614 DNA gyrase beta subunit (<i>gyrB</i>) gene partial cds.
<i>P. piscicola</i>	Photobacterium piscicola strain NCCB 100380 DNA gyrase subunit B DEFINITION Photobacterium piscicola strain NCCB 100380 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene partial cds.
<i>P. iliopiscarium</i>	Photobacterium iliopiscarium partial <i>gyrB</i> gene for gyraseB isolate DEFINITION Photobacterium iliopiscarium partial <i>gyrB</i> gene for gyraseB isolate J7C14.
<i>P. phosphoreum</i>	Photobacterium phosphoreum partial <i>gyrB</i> gene for gyraseB isolate DEFINITION Photobacterium phosphoreum partial <i>gyrB</i> gene for gyraseB isolate J8C15.
<i>P. kishitanii</i>	Photobacterium kishitanii strain calba.5.9 DNA gyrase subunit B DEFINITION Photobacterium kishitanii strain calba.5.9 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene partial
<i>P. aquimaris</i>	Photobacterium aquimaris <i>gyrB</i> gene for gyrase B subunit partial DEFINITION Photobacterium aquimaris <i>gyrB</i> gene for gyrase B subunit partial cds strain: LC2-068.
<i>P. angustum</i>	Photobacterium angustum strain ATCC 25915 DNA gyrase subunit B DEFINITION Photobacterium angustum strain ATCC 25915 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene partial cds.
<i>P. mandapamensis</i>	Photobacterium leiognathi subsp. mandapamensis strain ppana.3.1 DNA DEFINITION Photobacterium leiognathi subsp. mandapamensis strain ppana.3.1 DNA gyrase beta subunit (<i>gyrB</i>) gene partial cds.
<i>P. leiognathi</i>	Photobacterium leiognathi strain ATCC 25587 DNA gyrase subunit B DEFINITION Photobacterium leiognathi strain ATCC 25587 DNA gyrase subunit B (<i>gyrB</i>) gene partial cds.
<i>gapA</i>	
<i>P. indicum</i>	Photobacterium indicum strain ATCC 19614 glyceraldehyde-3-phosphate DEFINITION Photobacterium indicum strain ATCC 19614 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA</i>) gene partial cds.
<i>P. piscicola</i>	Photobacterium piscicola strain NCCB 100381 DEFINITION Photobacterium piscicola strain NCCB 100381 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA</i>) gene partial cds.
<i>P. iliopiscarium</i>	Photobacterium iliopiscarium strain NCIMB 13476 DEFINITION Photobacterium iliopiscarium strain NCIMB 13476 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA</i>) gene partial cds.
<i>P. phosphoreum</i>	Photobacterium phosphoreum strain ATCC 11040 DEFINITION Photobacterium phosphoreum strain ATCC 11040 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA</i>) gene partial cds.
<i>P. kishitanii</i>	Photobacterium kishitanii strain ATCC BAA-1194 DEFINITION Photobacterium kishitanii strain ATCC BAA-1194 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA</i>) gene partial cds.
<i>P. aquimaris</i>	Photobacterium aquimaris <i>gapA</i> gene for glyceraldehyde-3-phosphate DEFINITION Photobacterium aquimaris <i>gapA</i> gene for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase partial cds strain: LC2-068.
<i>P. angustum</i>	Photobacterium angustum strain ATCC 33975 DEFINITION Photobacterium angustum strain ATCC 33975 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA</i>) gene partial cds.
<i>P. mandapamensis</i>	Photobacterium mandapamensis strain ATCC 27561 DEFINITION Photobacterium mandapamensis strain ATCC 27561 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA</i>) gene partial cds.
<i>P. leiognathi</i>	Photobacterium leiognathi strain ATCC 25521 DEFINITION Photobacterium leiognathi strain ATCC 25521 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (<i>gapA</i>) gene partial cds.
<i>recA</i>	
<i>P. indicum</i>	Photobacterium indicum strain ATCC 19614 recombinase A (<i>recA</i>) gene DEFINITION Photobacterium indicum strain ATCC 19614 recombinase A (<i>recA</i>) gene partial cds.
<i>P. piscicola</i>	Photobacterium piscicola strain NCCB 100381 recombinase A (<i>recA</i>) DEFINITION Photobacterium piscicola strain NCCB 100381 recombinase A (<i>recA</i>) gene partial cds.
<i>P. iliopiscarium</i>	Photobacterium iliopiscarium strain ATCC 51760 RecA (<i>recA</i>) gene DEFINITION Photobacterium iliopiscarium strain ATCC 51760 RecA (<i>recA</i>) gene partial cds.
<i>P. phosphoreum</i>	Photobacterium phosphoreum partial <i>recA</i> gene strain LMG 4233T. DEFINITION Photobacterium phosphoreum partial <i>recA</i> gene strain LMG 4233T.
<i>P. kishitanii</i>	Photobacterium kishitanii strain vrhip.1.2 <i>recA</i> protein (<i>recA</i>) DEFINITION Photobacterium kishitanii strain vrhip.1.2 <i>recA</i> protein (<i>recA</i>) gene partial cds.
<i>P. aquimaris</i>	Photobacterium aquimaris strain NCCB 100386 recombinase A (<i>recA</i>) DEFINITION Photobacterium aquimaris strain NCCB 100386 recombinase A (<i>recA</i>) gene partial cds.
<i>P. angustum</i>	Photobacterium angustum partial <i>recA</i> gene strain LMG 8455T. DEFINITION Photobacterium angustum partial <i>recA</i> gene strain LMG 8455T.

<i>P. mandapamensis</i>	Photobacterium mandapamensis strain gjord.1.5 recA protein (recA) DEFINITION Photobacterium mandapamensis strain gjord.1.5 recA protein (recA) gene partial cds.
<i>P. leiognathi</i>	Photobacterium leiognathi strain smega.4.2 recA protein (recA) DEFINITION Photobacterium leiognathi strain smega.4.2 recA protein (recA) gene partial cds.
16S rRNA	
<i>P. indicum</i>	Photobacterium indicum gene for 16S rRNA partial sequence. DEFINITION Photobacterium indicum gene for 16S rRNA partial sequence.
<i>P. piscicola</i>	Photobacterium piscicola strain NCCB 100098 16S ribosomal RNA DEFINITION Photobacterium piscicola strain NCCB 100098 16S ribosomal RNA partial sequence.
<i>P. iliopiscarium</i>	Photobacterium iliopiscarium gene for 16S ribosomal RNA partial DEFINITION Photobacterium iliopiscarium gene for 16S ribosomal RNA partial sequence.
<i>P. phosphoreum</i>	Photobacterium phosphoreum 16S rRNA gene strain FR7. DEFINITION Photobacterium phosphoreum 16S rRNA gene strain FR7.
<i>P. kishitani</i>	Photobacterium kishitani gene for 16S rRNA partial sequence DEFINITION Photobacterium kishitani gene for 16S rRNA partial sequence strain: LC2-074.
<i>P. aquimaris</i>	Photobacterium aquimaris gene for 16S rRNA partial sequence DEFINITION Photobacterium aquimaris gene for 16S rRNA partial sequence strain: LC2-068.
<i>P. angustum</i>	Photobacterium angustum gene for 16S rRNA partial sequence DEFINITION Photobacterium angustum gene for 16S rRNA partial sequence strain: LC1-920.
<i>P. mandapamensis</i>	Photobacterium mandapamensis strain R1m5 16S ribosomal RNA gene DEFINITION Photobacterium mandapamensis strain R1m5 16S ribosomal RNA gene partial sequence.
<i>P. leiognathi</i>	Photobacterium leiognathi gene for 16S rRNA partial sequence DEFINITION Photobacterium leiognathi gene for 16S rRNA partial sequence strain: LC2-071.

Vedlegg C

Eksempel på agarose gel



Eksempel på agarose gel som ble kjørt med PCR-produktene av *recA* fra 15 *Photobacterium* stammer. Positive bånd av *recA* sekvensene vises ved ca. 600 bp. Isolasjons-ID på toppen av hver brønn angir *Photobacterium* stammen som ble analysert. (Bilde: eget)



Eksempel på agarose gel som ble kjørt med PCR-produktene av *gyrB* fra 13 *Photobacterium* stammer. Positive bånd av *gyrB* sekvensene vises ved ca. 1000 bp. Isolasjons-ID på toppen av hver brønn angir *Photobacterium* stammen som ble analysert. (Bilde: eget)

Vedlegg D

Resultater fra screeningsforsøk ved ulike temperaturer

Vekst av 54 *Photobacterium* stammer etter 7 dager på TSA + 1 % NaCl ved 4, 8, 15 og 20 °C. Verdiene viser gjennomsnittlig evalueringstall (0-3) for vekst av stammer som er isolert fra tre ulike isolasjonsatmosfærer; MAP (n=18), vakuum (n=18) og luft (n=18). Forskjellige små bokstaver (^{abc}) indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene (MAP, vakuum og luft) og er beregnet ved bruk av ANOVA ($p < 0,05$).

Temperatur	MAP	Vakuum	Luft	p-verdi (^{abc})
4 °C	1,266 ^a	1,333 ^a	1,095 ^a	$p < 0,05$
8 °C	1,466 ^a	1,666 ^a	1,476 ^a	$p < 0,05$
15 °C	1,933 ^a	2,111 ^a	1,857 ^a	$p < 0,05$
20 °C	2,888 ^a	2,833 ^a	2,833 ^a	$p < 0,05$

Vekst av 54 *Photobacterium* stammer etter 7 dager på TSA + 1 % NaCl ved 4, 8, 15 og 20 °C. Verdiene viser gjennomsnittlig evalueringstall (0-3) for vekst av stammer som er isolert i fra to ulike fangsts sesonger; april (n=27) og september (n=27). Forskjellige små bokstaver (^{abc}) indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene (april og september) og er beregnet ved bruk av uparet t-test ($p < 0,01$).

Temperatur	September	April	p-verdi (^{abc})
4 °C	1,177 ^a	1,481 ^b	$p < 0,01$
8 °C	1,185 ^a	1,888 ^b	$p < 0,001$
15 °C	1,629 ^a	2,296 ^b	$p < 0,001$
20 °C	2,703 ^a	3,000 ^b	$p < 0,01$

Vedlegg E

Resultater fra screeningsforsøk ved ulike saltkonsentrasjoner

Vekst av 54 *Photobacterium* stammer etter 7 dager på TSA + 1 % NaCl ved 4, 8, 15 og 20 °C. Verdiene viser gjennomsnittlig evalueringstall (0-3) for vekst av stammer som er isolert fra tre ulike isolasjonsatmosfærer; MAP (n=18), vakuum (n=18) og luft (n=18). Forskjellige små bokstaver (^{abc}) indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene (MAP, vakuum og luft) og er beregnet ved bruk av ANOVA ($p < 0,01$).

Temperatur	NaCl	MAP	Vakuum	Luft	p-verdi (^{abc})
4 °C	0 %	1,833 ^a	1,555 ^a	1,555 ^a	$p < 0,01$
4 °C	3 %	1,555 ^a	1,555 ^a	1,277 ^a	$p < 0,01$
4 °C	6 %	0,333 ^a	0,277 ^a	0,222 ^a	$p < 0,01$
15 °C	0 %	2,555 ^a	2,611 ^a	2,555 ^a	$p < 0,01$
15 °C	3 %	2,611 ^a	2,500 ^a	2,388 ^a	$p < 0,01$
15 °C	6 %	0,333 ^a	0,722 ^a	0,611 ^a	$p < 0,01$

Vekst av 54 *Photobacterium* stammer etter 7 dager på TSA + 1, 3 og 6 % NaCl ved 4 og 15 °C. Verdiene viser gjennomsnittlig evalueringstall (0-3) for vekst av stammer som er isolert ved to ulike fangsts sesonger (april og september). Forskjellige små bokstaver (abc) indikerer signifikante forskjeller mellom gruppene (april og september) og er beregnet ved bruk av uparet t-test ($p \leq 78$).

Temperatur	NaCl	September	April	p-verdi (^{abc})
4 °C	0 %	1,81 ^a	1,48 ^b	$p < 0,05$
4 °C	3 %	1,44 ^a	1,48 ^a	$p = 0,78$
4 °C	6 %	0,22 ^a	0,33 ^a	$p = 0,37$
15 °C	0 %	2,51 ^a	2,62 ^a	$p = 0,5$
15 °C	3 %	2,40 ^a	2,59 ^a	$p = 0,31$
15 °C	6 %	0,70 ^a	0,59 ^a	$p = 0,40$

