



Forord

Denne oppgaven ble skrevet som avsluttende del av en mastergrad i matvitenskap, retning matvaretrygghet, kvalitet, og hygiene ved Norges Miljø- og Biovitenskapelige Universitet (NMBU). Oppgaven ble utført på mikrobiologisk laboratorium ved avdeling for trygg og holdbar mat på Nofima.

Tiden på Nofima har vært svært lærerikt og spennende, og forhåpentligvis har jeg tilegnet meg kunnskap og erfaringer som kommer til nytte senere i livet. Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere ved Nofima, forsker Trond Møretrø og forsker Solveig Langsrud for god veiledning, både under laboratoriearbeid og under skriveprosessen. Takk til senioringeniør Merete Rusås Jensen for gode råd og hjelp på laboratoriet, og en takk rettes også til de øvrige ansatte ved avdeling for trygg og holdbar mat.

Jeg vil også takke min hovedveileder fra Institutt for Kjemi, Bioteknologi og Matvitenskap (IKBM) ved NMBU, Hilde Marit Østlie.

Til sist vil jeg rette en stor takk til min kommende ektemann, Steffan Kvilhaug Kinn, for god støtte og endeløs tålmodighet.

Ås, september 2015

Emma Undrum

Sammendrag

Målet med denne oppgaven var å identifisere bakterier som produserte hydrogen sulfid (H_2S), fortrinnsvis *Shewanella*, fra prosesseringsanlegg for laks, og undersøke deres karakteristiske egenskaper med på fokus på forringelse av kvaliteten til fisk og fiskeprodukter.

Bakterier som ble isolert fra prosesseringsanlegg for laks, og som produserte H_2S , ble i hovedsak identifisert som *Shewanella* sp., etterfulgt av *Aeromonas* sp., og *Morganella* sp. Flere av bakteriestammene som ble undersøkt for karakteristiske egenskaper hadde potensiale for forringelse av kvaliteten til fisk og fiskeprodukter, med det var variasjon mellom stammene.

Det ble også identifisert stammer av *Shewanella* som ikke produserte H_2S på jernagar med L-cystein og tiosulfat som svovelkilder. Bakteriestammer av *Shewanella* som ikke produserte H_2S på jernagar ble observert å ha mindre potensiale for kvalitetsforringelse enn stammer som produserte H_2S på jernagar, men med noen unntak. Bakteriestammer av *Shewanella* viste stor diversitet for ulike tester, og det var liten entydig sammenheng med fylogenetisk tilhørighet. Det ble allikevel observert at flere bakteriestammer nært beslektet *Shewanella putrefaciens*, og bakteriestammer av *Aeromonas* sp., og *Morganella* sp., viste stort potensiale for kvalitetsforringelse da de vokste ved 4 °C, i 1 % NaCl, og produserte illeluktende odører som H_2S og trimetylamin (TMA).

Abstract

The goal with this assignment was to identify bacteria that produced hydrogen sulphide (H₂S), preferably *Shewanella*, from processing plants for salmon, and investigate their characteristic abilities regarding spoilage of fish and fish products.

Bacteria isolated from processing plants for salmon, and that produced H₂S, was mainly identified as *Shewanella* sp., followed by *Aeromonas* sp., and *Morganella* sp. Many of the bacteria strains that were investigated for characteristic abilities were shown to have spoilage potential, but it was variation between the strains.

It was also identified strains of *Shewanella* that did not produce H₂S on iron agar with L-cysteine and thiosulphate as sulfur sources. *Shewanella* strains that did not produce H₂S on iron agar was observed to have less potential for spoilage than strains that did produce H₂S, but with some exceptions. The *Shewanella* strains showed great diversity for different tests, and it was little unambiguous correlation with phylogenetic affiliation. It was still observed that several strains closely related to *Shewanella putrefaciens*, and strains of *Aeromonas* sp., and *Morganella* sp., showed most spoilage potential when they grew in 4 °C, in 1 % NaCl, and they produced foul odors like H₂S and trimethylamine (TMA).

Innhold

1. Innledning.....	6
2. Teori.....	7
2.1. Renhold i prosesseringsanlegg for fisk og fiskeprodukter	7
2.2. Forringelse av fersk fisk og fiskeprodukter.	8
2.2.1. Spesifikke forringelsesbakterier	8
2.2.2. Reduksjon av TMAO til TMA.....	9
2.2.3. Produksjon av H ₂ S.....	10
2.3. <i>Shewanella</i>	11
2.3.1. <i>S. putrefaciens</i>	12
2.3.2. <i>S. baltica</i>	13
2.3.3. <i>S. frigidimarina</i>	13
2.3.4. <i>S. vesiculosa</i>	13
2.4. <i>Aeromonas</i>	14
2.5. <i>Morganella</i>	14
3. Materialer og metoder.....	16
3.1 Medier og løsninger	16
3.1.1 Medier	16
3.1.2. Reagenser Polymerase Chain Reaction (PCR) og 16S ribosomal DNA sekvensering	16
3.2 Metoder.....	17
3.2.1 Prøveuttak	19
3.2.2 Opparbeiding av bakterieprøver til PCR.....	20
3.2.3 Opparbeiding av bakterieprøver til- og utføring av gelelektroforese	21
3.2.4. Opparbeiding av bakterieprøver til Chain- terminating sekvensering	22
3.2.5. Identifisering av bakteriestammer og utforming av fylogenetisk tre for <i>Shewanella</i> sp....	22
3.2.6 Produksjon av H ₂ S fra ulike svovelkilder	23
3.2.7. Karakterisering og identifisering av bakteriestammer med API 20 NE	24
3.2.8. Reduksjon av TMAO til TMA.....	25
3.2.9. Vekst ved ulike temperaturer og produksjon av lukt	25
3.2.10. Vekst i ulike saltkonsentrasjoner.....	27
4. Resultater	28
4.1. Isolering og rendyrking av bakteriestammer	28
4.2. Identifisering av bakterieslekter.....	30
4.3. Fylogenetisk tre for bakteriestammer av <i>Shewanella</i> sp.	32

4.4. Karakterisering av identifiserte bakteriestammer	35
4.4.1. Produksjon av H ₂ S med ulike svovelkilder.....	35
4.4.2. Karakterisering og identifisering av stammer ved API 20 NE	37
4.4.3. Reduksjon av TMAO til TMA.....	45
4.4.4 Vekst ved ulike temperaturer.....	48
4.4.5. Vekst i ulike saltkonsentrasjoner.....	50
4.4.6. Produksjon av lukt	51
5. Diskusjon	52
5.1. Isolering og identifisering av bakterier fra prosesseringsanlegg for laks	52
5.2. Produksjon av H ₂ S fra ulike svovelkilder	54
5.3. Karakterisering og identifisering med API 20 NE.....	55
5.3.1. Karakterisering	55
5.3.2. Identifisering.....	57
5.4. Reduksjon av TMAO til TMA.....	58
5.5. Vekst ved ulike temperaturer.....	60
5.6. Vekst i ulike saltkonsentrasjoner.....	61
5.7. Produksjon av lukt	62
6. Konklusjon	63
7. Forslag til videre arbeid	63
8. Referanser	64
Vedlegg 1. Medier og løsninger	74
Vedlegg 2. Reagenser	76
Vedlegg 3. Produksjon av H₂S og kolonimorfologi.....	76
Vedlegg 4. Reduksjon av TMAO.....	79

1. Innledning

I 2013 anslo FN at verdens befolkning vil øke fra 7,2 milliarder (2013) til 9,6 milliarder mennesker frem til år 2050 (UN, 2013a). Denne økningen av mennesker medfører at næringsmiddelproduksjonen må øke med ca. 60 % basert på næringsmiddelproduksjon i 2005 (UN, 2013b). For å kunne nå dette målet må blant annet tap av næringsmidler *post- harvest* reduseres kraftig, da det har blitt anslått at hele 1,3 milliarder tonn med mat kastes hvert år (Gustavsson et al., 2011).

For mange mennesker er fisk og fiskeprodukter en viktig del av kostholdet. Sjømat er næringsrikt og inneholder blant annet flerumettede fettsyrer som omega- 3. Av de 1,3 milliarder tonn med mat som kastes hvert år inngår det 10 til 12 millioner tonn med fisk som går tapt kun på grunn av kvalitetsforringelse (FAO, 2015). I utviklingsland vil mesteparten av fisken som går tapt bli tapt under produksjon og distribusjon, mens i industriland blir store deler av fisken kastet av forbruker (Gustavsson et al., 2011). Mikrobiell forringelse av produktene er sannsynligvis en stor grunn til at så mye fisk og fiskeprodukter kastes.

Kvalitetsforringende bakterier er et problem ved produksjon av laks- og andre fiskeprodukter da fisk har et naturlig høyt proteininnhold, og det oppstår også lite pH- endring i fiskemuskel *post- mortem* (Gram og Huss, 2000; Adams og Moss, 2008). Dette medfører at mikroorganismer som spesifikke forringelsesbakterier kan vokse på fisk og fiskeprodukter, produsere illeluktende komponenter som for eksempel hydrogensulfid (H₂S) og trimetylamin (TMA), og dermed gjøre produktet lite attraktivt for konsumering (Serio et al., 2013; Gram og Huss, 2000).

Det har blitt utført lite forskning på hvordan disse mikroorganismene blir ført inn i prosesseringsanleggene, om de overlever renholdsrutiner, og om de krysskontaminerer ferdig produkt.

Denne oppgaven er en del av forskningsprosjektet «*Produksjonshygiene og holdbarhet av pré-rigor laksefilet*», et samarbeid mellom Nofima og Fiskeri- og Havbruksnæringens Forskningsfond (FHF). Målet med denne oppgaven var å identifisere H₂S- produserende bakterier, fortrinnsvis *Shewanella*, og karakterisere bakterienes egenskaper og potensiale til kvalitetsforringelse av fisk og fiskeprodukter.

2. Teori

2.1. Renhold i prosesseringsanlegg for fisk og fiskeprodukter

For å unngå at fisk og fiskeprodukter blir forringet og ikke lengre egner seg til forbruk må det blant annet være god hygiene i prosesseringsanleggene og opprettholdelse av kjølekjeden (Granum, 2011; Fellows, 2009). God hygiene hindrer spredning av mikroorganismer og kontaminering av fisk og fiskeproduktene. Dårlig hygiene kan føre til økt forringelse, noe som kan medføre at produktene lettere blir kastet av forbruker. Krysskontaminering av mikroorganismer til fisk og fiskeprodukter kan også medføre sykdom hos konsument.

Det har blitt gjort lite forskning rundt hygiene og renhold i prosesseringsanlegg for laks og annen fisk og fiskeprodukter. Det har allikevel blitt vist at flere mikroorganismer har evne til å feste seg og kolonisere på produksjonsutstyr som behandler fisk og fiskeprodukter (Bugge-Ravn et al., 2003). Etter vask og desinfeksjon er det observert mikroflora dominert av *Pseudomonas* spp. og gjær på produksjonsutstyr. Disse mikroorganismene har god evne til å feste seg til overflater og overleve uten næringsstoffer, og det har også blitt vist at de er mer resistente mot vask- og desinfeksjonsmidler (Bugge-Ravn et al., 2003; Wirtanen og Matilla-Sandholm, 1992). Langsrud et al., (2015) viste at laksefileter produsert på ettermiddagen i prosesseringsanlegg for laks ga lavere totalantall av mikroorganismer enn laksefileter produsert tidlig på morgen. Dette tyder på at transportbånd, utstyr, tanker, osv. ikke blir tilstrekkelig vasket og rengjort etter produksjonsdagen. På morgenen når de første laksefiletene blir prosessert vil filetene bli smittet med bakterier fra tidligere produksjoner. Utover dagen vil bakteriene på overflatene komme i kontakt med svært mange fileter og bakteriekonsentrasjonen vil da bli fortynnet (Langsrud et al., 2015). Det ble også funnet at *Pseudomonas* sp., og *Shewanella* sp., ble isolert fra utstyr og laksefileter i slakteavdelingen, men *Shewanella* sp., ble i mye mindre grad isolert fra fileteringsavdelingen (Langsrud et al., 2015). Dette kan skyldes at det er høye bakterietall fra laks ved slakt og sløyning som forurenser utstyret i slakteavdelingen mye mer enn i fileteringsavdelingen. Det vil da være vanskeligere å vaske bort og desinfisere alle bakteriene i slakteriavdelingen enn ved fileteringsavdelingen der det i utgangspunktet ikke fantes så mange bakterier (Langsrud et al., 2015).

2.2. Forringelse av fersk fisk og fiskeprodukter.

Fersk fisk er et næringsmiddel som er svært utsatt for forringelse, enten forårsaket av mikroorganismer eller kjemiske reaksjoner (Serio et al., 2013).

Kjemisk sammensetning av fisk varierer på grunn av art, miljø, alder, osv., men i hovedsak består fisk av ca. 20 % protein, 1 til 2 % ikke- protein nitrogen og de resterende prosentene (ca. 78%) består av vann og lipider (Gram og Huss, 2000). Ratioen mellom vann og lipider varierer med sesong og art (Gram og Huss, 2000).

I denne oppgaven er det fokusert på mikrobiell forringelse, derfor er kun dette beskrevet nedenfor.

På fersk, ubehandlet fisk vil det finnes bakterier på og i gjellene, på skinnen og i tarmsystemet, der kolonidannende enheter varierer mellom 10^2 - 10^7 cfu cm^{-2} på skinnen, og 10^3 - 10^9 cfu g^{-1} i gjellene og tarmsystemet (Adams og Moss, 2008). Ved slakting og bearbeiding av fisken vil disse bakteriene bli overført til fiskekjøttet (Gram og Huss, 2000). Bakteriene som dominerer på fisken i levende tilstand avhenger av hvilket miljø fisken kommer ifra, og også årstid (Vogel et al, 2005). Mikroflora på fisk fra kalde vann domineres som oftest av Gram- negative, psykrotrofe og psykrofile, stavlignende bakterier. Dette omfatter blant annet slekter som *Shewanella*, *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Psychrobacter*, *Vibrio*, og *Flavobacterium*, men det finnes også en mindre andel Gram- positive bakterier, som blant annet melkesyrebakterier (Adams og Moss, 2008; Gram og Huss, 2000). Fisk fra varmere strøk har ofte en større andel Gram- positive bakterier i sin mikroflora (Gram og Huss, 2000). Det har også blitt vist at det finnes gjær på fiskeskinn, og i tarmsystem og gjeller på fisk (Ross og Morris, 1965).

2.2.1. Spesifikke forringelsesbakterier

På kvalitetsforringet fisk vil det normalt bli isolert mellom 10^7 - 10^8 cfu g^{-1} bakterier, men ikke alle bakteriene i mikrofloraen til et næringsmiddel vil bidra til forringelse (Gram et al., 1986). Det er kun spesifikke forringelsesbakterier som forringer kvaliteten til fisk og andre næringsmidler, og som gir næringsmiddelet et lite tiltalende utseende og som produserer vond lukt (Serio et al., 2013). Det er i hovedsak Gram- negative psykrofile eller psykrotrofe bakterier som er spesifikke forringelsesbakterier (Gram et al., 1986). De vanligste spesifikke forringelsesbakteriene i fisk og fiskeprodukter er *Shewanella putrefaciens*, *Photobacterium phosphoreum*, melkesyrebakterier og *Pseudomonas* ssp. (Rudi et al., 2004; Gennari et al.,

1999). Det ble funnet at på fisk lagret på is i ni- ti døgn vil *S. putrefaciens* (tidligere *Alteromonas putrefaciens*) dominere (Gram et al., 1986).

Vekst av bakterier vil medføre metabolisering og dannelse av ulike kjemiske stoffer. Organiske syrer, aminer, alkoholer, sulfider, ketoner, estere og aldehyder er typiske kjemiske komponenter som dannes når et næringsmiddel blir brutt ned, og som ofte forbindes med forringelse (Gram og Huss, 2000). Identifisering av spesifikke forringelsesbakterier skjer ved å undersøke mikroorganismens evne til å produsere illeluktende odører og forringende metabolitter, som evne til å redusere den luktfrie trimetylamin N- oksid (TMAO) til den illeluktende TMA, og produksjon av H₂S (Gram og Huss, 2000).

Fisk inneholder naturlig lite karbohydrater, og under døds kampen vil glykogenlagrene bli ytterligere tømt (Adams og Moss, 2008). *Post- mortem* vil karbohydratene bli omgjort til melkesyre som akkumulerer i muskelene. Hos andre dyrearter som for eksempel storfe vil pH i muskelen *musculus longissimus dorsi* falle fra pH 7,2 til pH 5,5 innen 24 timer *post- mortem* (Warris, 2010). I fiskemuskel vil det bli lite fall i pH *post- mortem*, og pH i fiskemuskel vil da være mellom 6,2- 6,5 som vil medføre at pH- sensitive bakterier kan vokse på fiskemuskelen (Adams og Moss, 2008).

Ikke- protein nitrogen er vannløselige, nitrogenholdige komponenter med lav molekylvekt som inkluderer frie aminosyrer, nukleotider, og også TMAO (Gram og Huss, 2000). Lerke et al., (1967) viste at spesifikke forringelsesbakterier har evne til å bryte ned ikke- protein nitrogen og bruke det som næring. Proteiner (molekyler med høy vekt) og ikke- protein nitrogen (molekyler med lav vekt) i fiskejuice ble separert og det ble produsert vonde odører kun i fraksjonen med ikke- protein nitrogen (Lerke et al., 1967).

2.2.2. Reduksjon av TMAO til TMA

En indikator på en bakterie sin evne til å forringe kvaliteten til fisk og fiskeprodukt er reduksjon av luktløse TMAO til TMA, som gir en karakteristisk lukt av gammel/ råttent fisk (Gram og Huss, 2000). I følge Serio et al., (2013) er slekten *Shewanella* den spesifikke forringelsesbakterien som produserer mest TMA. «*Tendensen til et medium for å akseptere eller donere elektroner, til å oksidere eller redusere, er bestemt av redox- potensialet (E_h)*» (Adams og Moss, 2008). I fiskefilet er redox- potensialet til TMAO/ TMA mellom +100 til +300 mV så lenge TMAO ikke er redusert (Gram og Huss, 2000). TMAO da kan ha positiv effekt for vekst av anaerobe eller

fakultativt anaerobe mikroorganismer som er i stand til å bruke TMAO som terminal elektronakseptor i elektrontransportkjeden under anaerobe forhold (Easter et al., 1982; Gram og Huss, 2000).

Side TMAO reduseres til den illeluktende TMA i fiskeprodukter kan det medføre økonomisk tap for produsenter, og det kan også medføre at forbrukere kaster mer mat. Det må derfor være fokus på hvordan fisk og fiskeprodukter pakkes og lagres for å redusere produksjon av TMA. Boskou og Debevere (1998) viste at det ikke var produksjon av TMA fra *S. putrefaciens* når det var nok oksygen (minimum 10 %) til stede for aerob respirasjon. Det ble også vist i samme studie at det var redusert vekst og produksjon av TMA fra *S. putrefaciens* ved reduksjon av pH fra 6,8 til 5,8 (Boskou og Debevere, 1998). Easter (1982) så den samme trenden da enzymet TMAO- reductase fra *Alteromonas* spp., ble undersøkt. Enzymet mistet over 50 % av aktiviteten ved reduksjon av pH fra 6,8 til 6,0. I det samme forsøket fra Easter (1982) ble det også vist at oksygen har en hemmende effekt på TMAO- reductase, og at høye nivåer av CO₂ fører til en indirekte hemmende effekt på det samme enzymet ved reduksjon av pH. Lee (1981) viste at generasjonstiden til *S. putrefaciens* økte med økt CO₂ i modifisert atmosfære pakning, slik at produksjon av TMA ble redusert. Pakking av fisk og fiskeprodukter ved høy andel av CO₂ og noe O₂ tilstede vil hemme vekst av *S. putrefaciens* og produksjon av metabolske produkter (Boskou og Debevere, 1998). Det har allikevel blitt vist at fersk fisk pakket i modifisert atmosfære kun har forsinket produksjon av TMA grunnet *P. phosphoreum* som under anaerobe forhold benytter TMAO som elektronakseptor (Guldager et al., 1998).

2.2.3. Produksjon av H₂S

Som tidligere nevnt er produksjon av H₂S en indikator på bakteriestammer sin evne til å forringe fisk og fiskeprodukt, men også kvalitetsforringelse av andre næringsmidler som fjærkre og kjøtt (Gram og Huss, 2000; McMeekin og Patterson, 1975; Fernandez- Coll og Pierson, 1985). Svovel er nødvendig for synteser av blant annet aminosyrene cystein og metionin, og også flere koenzymmer (Willey et al., 2009). Ved aerob respirasjon vil en svovelkilde som sulfat bli redusert til hydrogensulfid som gir mer tilgjengelig svovelatomer for bakterier til å bruke i metabolismen (Willey et al., 2009).

Deteksjon av H₂S- produserende bakterier foregår som oftest på jernagar eller i medium tilsatt en svovelkilde. Ved produksjon av H₂S vil koloniene på jernagar fremstå som sorte, og vekst i

flytende medium vil også bli sort. Den sorte fargen kommer av at det blir dannet jernsulfid når produsert H₂S reagerer med jern som er tilsatt i agaren eller det flytende mediet.

Gram et al., (1986) viste at det ikke er likegyldig hvilken svovelkilde som tilsettes i jernagar eller annet medium, da tiosulfat som eneste svovelkilde ikke førte til produksjon av H₂S ved høy temperatur (20 °C) av H₂S- produserende bakterier isolert fra fisk. For å kunne detektere H₂S- produksjon ved høy temperatur måtte agaren eller mediet også tilsettes aminosyren L- cystein (Gram et al., 1986). L- cystein førte også til at koloniene som produserte H₂S ble mer sorte siden L- cystein er en reduktant (Gram et al., 1986).

2.3. *Shewanella*

Shewanella har blitt studert siden 1931 da den ble klassifisert som *Achromobacter putrefaciens* (Derby og Hammer, 1931). Siden den gang har den gjennomgått flere navneendringer før den i 1985 ble definert som en egen bakterieslekt (MacDonnell og Colwell, 1985). Den nye bakterieslekten ble oppkalt etter forsker James Shewan for sitt arbeid innen marin mikrobiologi. *Shewanella* ligger under gamma- *Proteobacteria* i familien *Vibrionaceae*. *Shewanella putrefaciens* var i 1985 den eneste arten av *Shewanella*, men til dags dato er det registrert hele 62 arter av *Shewanella* (LPSN, 2015).

Stenström og Molin (1990) fant at Gram- negative, ikke- fermentative, oksidase- og katalase positive bakterier som har evne til å redusere TMAO, produsere H₂S og har DNA med G+C mol % 44-47 kan defineres som *S. putrefaciens*. Etter flere år med forskning på de ulike artene av *Shewanella* ble det funnet at egenskapene Stenström og Molin brukte til å definere *S. putrefaciens* ikke kunne fortelle noe om bakterie på artsnivå, men at den tilhører slekten *Shewanella* (Vogel et al., 2005). Det har også blitt vist at G+C mol % i DNA hos *Shewanella* varierer fra 40- 54 % (Bowman et al., 1997). Alle *Shewanella* er stavformede, ikke- sporedannende, bakteriecellene er mellom 2-3 µm lange og 0,4-0,7 µm i diameter (Venkateswaran et al., 1999). *Shewanella* er også en bevegelig bakterieslekt og har da en flagelle som er 13,6 ± 3,1 nm lang (Dalgaard, 1995).

Shewanella har i utgangspunktet ikke evne til å fermentere karbohydrater som glukose, men det har allikevel blitt rapportert arter av *Shewanella* som har denne evnen (Bowman et al., 1997; Ivanova et al., 2001; Vogel et al., 2005). Det har også blitt vist at arter av *Shewanella*,

som *S. putrefaciens* og *Shewanella algae* kan være opportunistisk patogene (Brink et al., 1995; Khashe og Janda, 1998).

Bakteriestammer av *Shewanella*, spesielt fra artene *S. putrefaciens* og *Shewanella baltica* finnes i mange ulike marine miljøer, og er derfor ofte isolert fra fisk (Vogel et al., 2005). *Shewanella* har blitt isolert fra marine miljøer i tempererte og tropiske områder, fra både ferskvann og saltvann (Vogel et al., 2005; Spanggaard et al., 1993; Gram et al., 1990). Hvilken art av *Shewanella* som dominerer i de forskjellige miljøene er avhengig av ulike faktorer som for eksempel temperatur. Arter av *Shewanella* har blitt funnet å være mesofile (Ivanova et al., 2003; Venkateswaran et al., 1999), psykrotrofe (Venkateswaran et al., 1999), og psykrofile (Bozal et al., 2002). *Shewanella algae* som er mesofil, er den arten av *Shewanella* som ble observert å dominere på fisk fanget i varme sommermånedene i tempererte områder, men den ble ikke funnet på fisk fanget under vintermånedene. Ved kaldere temperaturer er det den psykrotrofe *S. baltica* som dominerer den mikrobiologiske floraen (Vogel et al., 2005).

I tillegg til at arter av *Shewanella* har blitt isolert fra miljøer med ulike temperaturer har det også blitt identifisert en psykrofil og barofil art kalt *Shewanella benthica* som ble isolert fra 2400 -6500 meter under havoverflaten (Nogi et al., 1998).

Det var fire arter av *Shewanella* som var av interesse for denne oppgaven, og disse beskrives derfor nedenfor.

2.3.1. *S. putrefaciens*

Shewanella putrefaciens (tidligere *Alteromonas putrefaciens*) har blitt fastslått å være den arten som bidrar til mest forringelse på fisk lagret ved 0 °C (Chai et al., 1968; Herbert et al., 1971; Jensen og Schultz, 1980; Gram et al., 1986). Gram et al., (1986) fant også at *S. putrefaciens* hadde en dominerende rolle ved forringelse av fisk ved høy temperatur (20 °C). *Shewanella putrefaciens* må være tilstede i et større antall enn 10^8 cfu/g for å kunne lage vond lukt ved for eksempel produksjon av H₂S (Dalgaard, 1995). *Shewanella putrefaciens* er en spesifikk forringelsesbakterie som produserer H₂S på jernagar med svovelkildene L- cystein og/ eller tiosulfat. Det har allikevel blitt isolert *S. putrefaciens* som ikke produserte sorte kolonier på jernagar, og noen av disse ikke-sorter *S. putrefaciens* produserte mye H₂S, men i andre medier enn på jernagar tilsatt L- cystein og/ eller tiosulfat (Serio et al., 2013; Gennari et al., 1999; Dalgaard, 1995).

Shewanella putrefaciens har blitt isolert fra både fersk- og saltvann (DiChristina og DeLong, 1993; Gram et al., 1990; Spanggaard et al., 1993). *Shewanella putrefaciens* er psykrotrof og kan vokse ved både 4 °C og 37 °C, mens optimumstemperaturen er vist å være mellom 25 – 35 °C (Ziemke et al., 1998; Venkateswaran et al., 1999). Det har allikevel blitt funnet stammer av *S. putrefaciens* som ikke vokse ved 4 °C (Vogel et al., 1997). Det har også blitt vist at *S. putrefaciens* har noen interessante egenskaper da den har evne til å redusere generasjonstiden når temperaturer reduseres (Shewan, 1977), og den kan også inducere korrosjon av metaller etter at bakteriene fester seg til rustfritt stål eller polypropylen og danner av biofilm (Bagge et al., 2001). *Shewanella putrefaciens* er også vist å ha et G+C innhold på 46,3±0,9 % (Dalgaard, 1995).

2.3.2. *S. baltica*

I 1998 ble *S. baltica* definert som en egen art etter å ha tidligere blitt klassifisert som *S. putrefaciens* (Ziemke et al., 1998). Vogel et al., (2005) viste at *S. baltica* var den arten av *Shewanella* som produserte mest H₂S, men det har også blitt rapportert stammer av *S. baltica* som ikke produserte H₂S (Ziemke et al., 1998). I følge karakteriseringskriteriene til Stenström og Molin (1990) for *Shewanella* skal *S. baltica* redusere TMAO til TMA. Det har allikevel blitt observert stammer av *S. baltica* som ikke reduserer TMAO (Serio et al., 2013). G+C innhold for *S. baltica* er 46,1 % (Ziemke et al., 1998).

2.3.3. *S. frigidimarina*

I 1997 fant Bowman et al., (1997) en rekke egenskaper for *S. frigidimarina*. Den kan vokse ved 8 % NaCl, og vekst kan foregå mellom <0 til 27- 28 °C med optimum 20 – 22 °C (Bowman et al., 1997). *Shewanella frigidimarina* har blitt observert å ha et G+C innhold for på 40- 43 % (Bowman et al., 1997).

2.3.4. *S. vesiculosa*

I 2009 ble *S. vesiculosa* identifisert som en egen art av Bozal et al., (2009). Det ble vist at *S. vesiculosa* har evne til vekst ved -4 °C til 30 °C, med optimumsvekst ved 15 °C til 20 °C (Bozal et al., 2009). Bakteriearten trenger ikke natrium for å vokse, men har optimal vekst ved 2 % NaCl, og den vokser ikke ved saltkonsentrasjon > 7 % (Bozal et al., 2009). Bakteriearten vokser optimalt ved pH 7,5, men den vokser også ved pH 6,0- 8,5 (Bozal et al., 2009). DNA G+C innhold er 42 mol %. (Bozal et al., 2009).

2.4. *Aeromonas*

Aeromonas er en ubikvitær slekt og har derfor blitt isolert fra en variasjon av ulike miljøer (Abbott et al., 1992; Kaznowski, 1998; Mateos et al., 1992). Vekstoptimum for *Aeromonas* er normalt oppfattet å være 28 °C, men det har blitt observert en variasjon av optimumstemperaturer (Popoff, 1984; Mateos et al., 1992). Det har også blitt observert at *Aeromonas* kan vokse ved temperaturer < 5 °C, og også i næringsmidler som kjøtt, fisk og meieriprodukter (Alhazmi, 2015; Devlieghere et al., 2000; Kirov og Brodribb, 1993).

Aeromonas sp. ble tidligere identifisert som *Vibrio* sp., da den er fenotypisk lik arter av *Vibrio*, og det er fremdeles problemer med dette i klinisk sammenheng da noen arter av *Aeromonas* er humanpatogene (Abbot et al., 1998). Flere arter av *Aeromonas* har vist å kunne produsere cytotoxiner ved 30 og/ eller 37 °C, og *Aeromonas hydrophilia* har vist å kunne produsere exotoksiner under lagring ved kjøleskapstemperatur i næringsmidler som f. eks melk, fisk, kamskjell (Granum et al., 1998; Kirov og Brodribb 1993). *Aeromonas hydrophilia* er et spesielt problem for næringsmiddelbransjen da den er vist å kunne vokse ved både 0,5 % og 4,0 % NaCl, ved 5 °C og 30 °C, og ved både sur og alkalisk pH (Vivekanandhan et al., 2003). Det har også blitt isolert arter av *Aeromonas* fra kvalitetsforringet melk, kjøttdeig og fisk, og det har blitt vist at *Aeromonas* sp., produserer illeluktende odører fra kvalitetsforringet fisk ved å redusere TMAO og produsere H₂S (Lindeberg, 1997; Gram et al., 1990).

Arter av *Aeromonas* er vist å være oksidase- og katalase positive, de har evne til å redusere nitrat, og de kan fermentere glukose (Kaznowski 1998; Abbott et al., 1992). *Aeromonas* danner H₂S fra medium med svovelkildene L- cystein og tiosulfat, dog ikke alle arter produserer H₂S ved kun L- cystein som svovelkilde (Abbott et al., 1992). *Aeromonas* er positive for cytocrom oksidase, produserer arginin dehydrolase, hydrolyserer gelatin, fermenterer mannitol, hydrolyserer ikke urea, og vokser ved 37 °C (Kaznowski 1998).

2.5. *Morganella*

Morganella ble først beskrevet i 1943 (Fulton, 1943) og i 1978 ble bakteriearten *Proteus morganii* omgjort til *Morganella morganii*, en bakterieslekt under familien *Enterobacteriaceae* (Fulton, 1943; Brenner et al., 1978; Gram og Huss, 2000). *Morganella morganii* er den eneste arten av *Morganella*. Bakteriene i slekten *Morganella* er Gram- negative, bevegelige staver som er negative for oksidase reaksjoner, men positive for katalase reaksjoner (Emborg et al., 2006). Stammer av *M. morganii* er vist å være både mesofile og psykrotolerante, og de har

blitt isolert fra fisk og fiskeprodukter, men også fra menneskelig avføring (Emborg et al., 2006). De er gelatinase- positive, og også urease- positive men det har blitt observert unntak (Emborg et al., 2006). Psykrotolerante stammer av *M. morganii* har vist evne til å vokse ved 0-2 °C, men ikke ved 37 °C slik som mesofile stammer (Emborg og Dalgaard, 2006). De mesofile stammene er også vist å kunne vokse ved 8,5 % NaCl (Emborg et al., 2006). *Morganella morganii* har evne til å dekarboksylerer aminosyrer slik at det blir dannet biogene aminer som histamin (Gram og Huss, 200). Det kan bli dannet store mengder histamin i fisk med mørk kjøtt, som for eksempel makrell og tunfisk, og inntak av for mye histamin kan føre til forgiftning (Adams og Moss, 2008). Det har også blitt vist at psykrotolerante stammer av *M. morganii* kan produsere histamin ved 5 °C, og at både psykrotolerante og mesofile stammer produserte store mengder histamin ved 10 °C (Emborg og Dalgaard, 2006; Emborg et al., 2006).

3. Materialer og metoder

3.1 Medier og løsninger

3.1.1 Medier

Alle medier ble sterilisert i CertoClav (A- 4050, Traun, Østerrike) ved 121 °C i 15 minutter. Flytende medier ble oppbevart på flasker ved romtemperatur, og agarer ble oppbevart som ferdigstøpte petriskåler pakket i plast ved 4 °C. Det ble benyttet destillert vann ved tillaging av mediene. Oppskrift på medier og løsninger benyttet i oppgaven er beskrevet i vedlegg 1. Følgende medier ble benyttet i oppgaven:

- Jernagar (Iron Agar) (Oxoid LTD, Hampshire, England)
- Long and Hammer buljong (Van Spreekens, 1974; NMKL, 2006)
- Trimetylamin N- oksid (TMAO) medium tilsatt metylenblått/ resazurin (Gram et al., 1986)

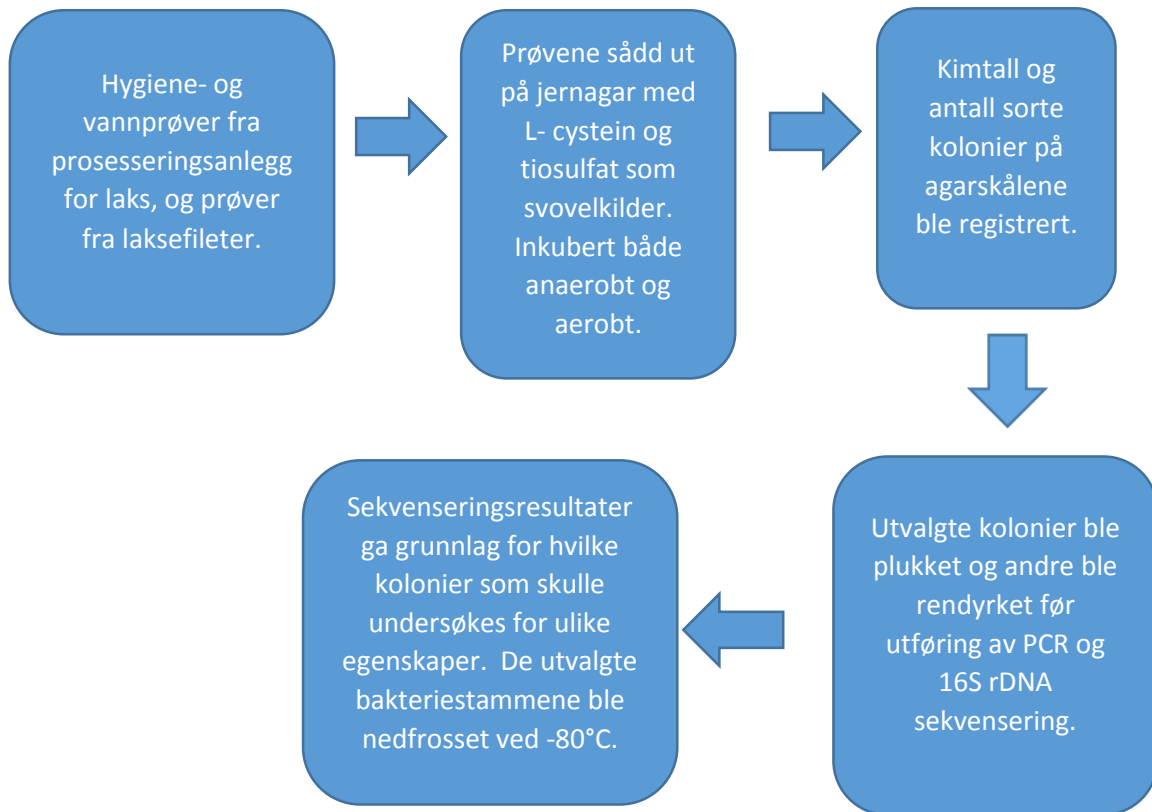
3.1.2. Reagenser Polymerase Chain Reaction (PCR) og 16S ribosomal DNA sekvensering

Oppskrift på reagenser brukt i denne oppgaven finnes i vedlegg 2.

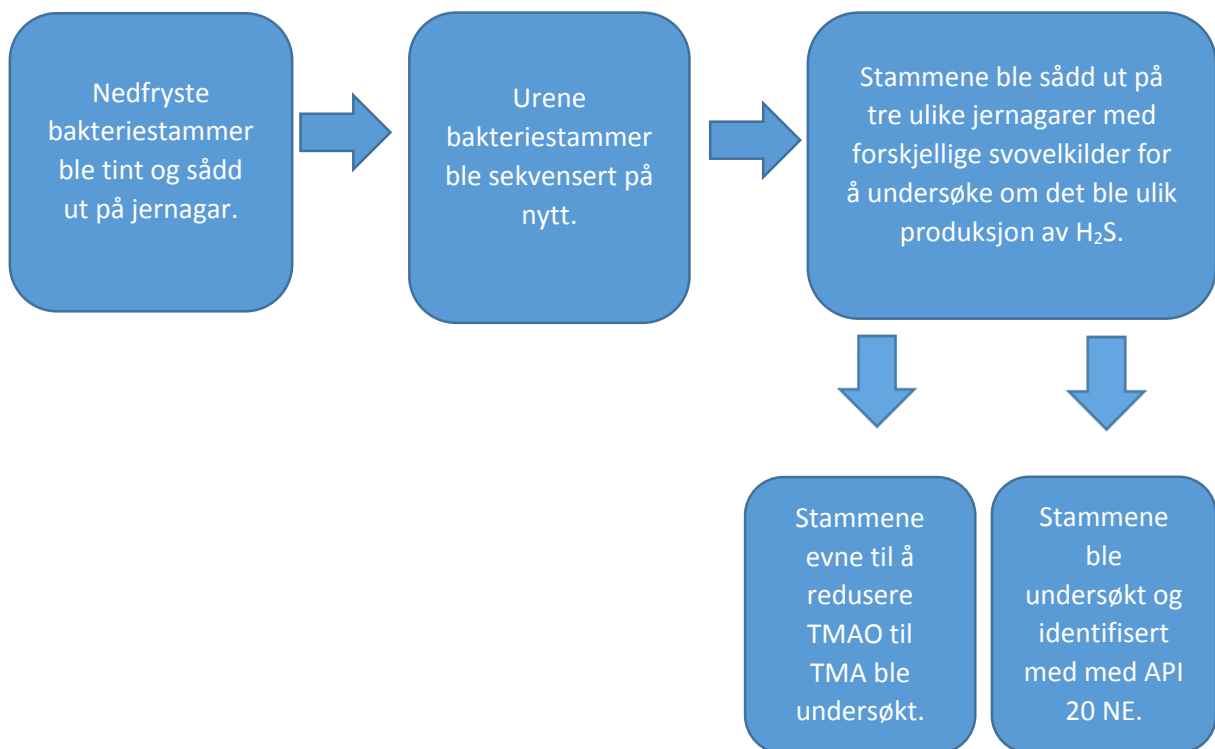
- GelRed Nucleic Acid Stain, 10,000X in water (Bioticum, Hayward, CA, USA)
- Orange mix
- Standard VI
- ExoSap- IT® (Affymetrix, UK)
- Big dye® Terminater V1.1, V3.1, 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- Big Dye® V1.1 Sequencing Standard (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- Mangala F, 3.2 µM (Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland)
- XTerminator™ Solution (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- SAM™ Solution (Applied Biosystems, Warrington, UK)
- Mangala F, 1.0 µM (Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland)
- Mangala R, 1.0 µM (Eurofins Genomics, Ebersberg, Tyskland)
- 5 PRIME HotMasterMix 2,5*1ml (5 PRIME GmbH, Hamburg, Tyskland)

3.2 Metoder

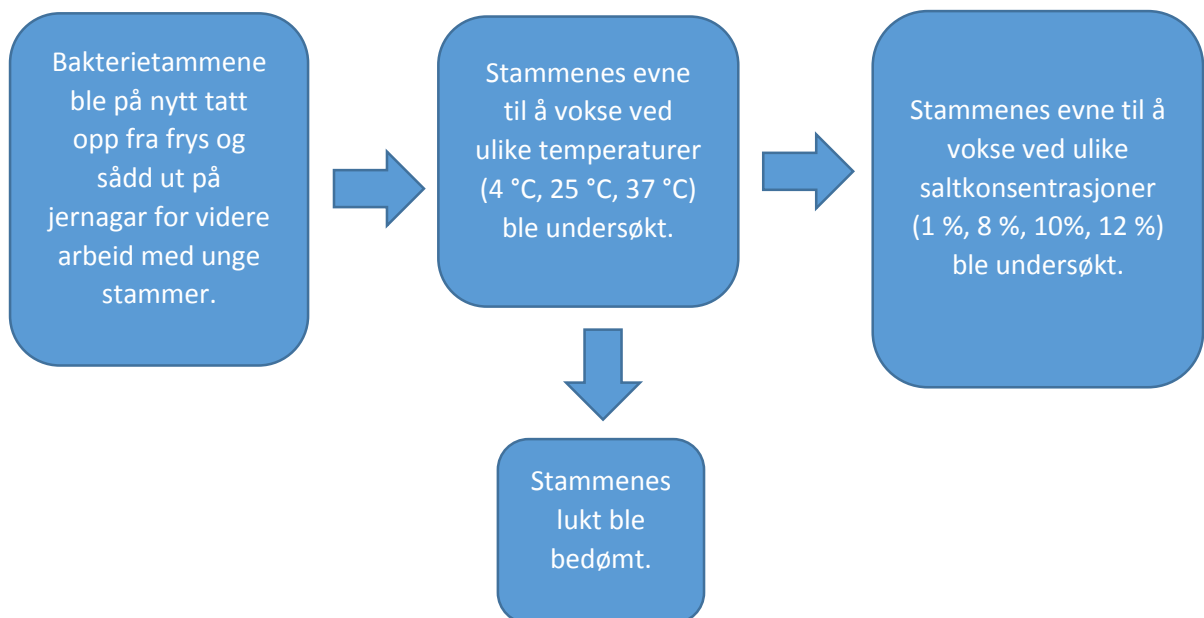
Det ble gjort flere ulike forsøk i denne oppgaven. For å gi en fullstendig oversikt over hvilke forsøk som ble gjort vises leser til figur 1a, 1b og 1c.



Figur 1a: Flytskjema for isolering og identifisering av bakterier fra produksjonsmiljø og fersk laks fra to prosesseringsanlegg for laks.



Figur 1b: Flytskjema for undersøkelse av bakteriestammer sine karakteristiske egenskaper for vekst ved ulike svovelkilder, reduksjon av TMAO, vekst og metabolisering ved ulike substrater, og identifisering med API 20 NE- identifiseringssystem.



Figur 1c: Flytskjema for undersøkelse av bakteriestammer sine karakteristiske egenskaper for vekst ved ulike temperaturer (4 °C, 25 °C, 37 °C), ulike saltkonsentrasjoner (1 %, 8 %, 10 %, 12 %) og produksjon av lukt.

3.2.1 Prøveuttak

I denne oppgaven ble det isolert bakterier fra vann, overflater og utstyr fra prosesseringsanlegg for laks, og også fra islagret laksefilet produsert på anleggene. Isoleringen foregikk ved anlegg A og anlegg B som begge hadde hele prosessen fra slakt til ferdig filet. Isoleringen av bakterieprøver fra begge bedriftene ble gjort av veiledere. Prøvene faller innenfor en av tre ulike kategorier; vannprøver, hygieneprøver eller prøver fra råvare.

Hygieneprøver ble tatt på overflater i produksjonsmiljøet med sterile kompresser (Mesoft®, Mölnlycke Health Care AB, Gøteborg, Sverige) på 100- 300 cm², og vannprøver ble tatt ved å filtrere 50 ml vann (30 ml i ett tilfelle på grunn av slam) gjennom ett filter (0.45µm, white, gridded, Microcheck II Beverage Monitor with GN- 6 Membrane, Pall Corporation, USA). Kompressene og filterne ble så lagt i rør med 15 ml Day Engely Neutralizing Broth (Becton-Dickinson, New Jersey, USA) for å nøytralisere antimikrobielle kjemikalier fra tidligere vask og desinfeksjon. Før transport til laboratoriet ble bakterieprøven fortynnet med peptonvann på grunn av forventet høye celletall, og deretter ble to paralleller fra hver prøve sådd ut på jernagar med L- cystein og tiosulfat som svovelkilder for aerob og anaerob inkubering. Ved ankomst til mikrobiologisk laboratorium på Nofima ble agarskålene med bakterieprøvene inkubert ved 15 °C i fem- syv døgn.

Ferske laksefileter ble lagt på is og sendt fra prosesseringsanleggene til mikrobiologisk laboratorium på Nofima. Laksefiletene ble tatt ut av prosesslinjen ved tre ulike trinn; etter filetering, etter ettertrimming, og ved pakking. Veileder og laboratorieingeniører ved mikrobiologisk laboratorium tok prøver fra laksekjøttet som var ca. 3*3*1 cm. Lakseprøvene ble så homogenisert sammen med peptonvann ved hjelp av en homogenisator (Smasher, AES Laboratories, Frankrike). Prøvene ble deretter sådd ut på jernagar med L- cystein og tiosulfat som svovelkilder og inkubert ved 15 °C i fem- syv døgn aerobt og anaerobt.

Ved endt inkubasjonstid ble kimtall og antall sorte kolonier på både aerobe og anaerobe jernagarskåler registrert av forfatter av denne oppgaven og laboratorieingeniør. Videre ble det plukket sorte kolonier fra de aerobe skålene for identifisering av bakterier. Det ble observert ulike typer sorte kolonier, og for hver type sort koloni ble det strøket ut tre eksemplarer til hver sin jernagarskål med L- cystein og tiosulfat. Det ble også plukket fem tilfeldige ikke- sorte kolonier fra hver av de aerobe jernagarskålene. Jernagarskålene ble så inkubert aerobt ved 15 °C i tre til fem døgn. Fra hver anaerob jernagarskål ble det plukket og

strøket ut 20 tilfeldige kolonier til nye jernagarskåler for identifisering. De nye agarskålene ble inkubert ved 15 °C anaerobt i to til tre døgn.

3.2.2 Opparbeiding av bakterieprøver til PCR

Opparbeiding av prøver til identifisering av de isolerte bakterieprøvene fra bedrift B inkubert aerobt ble gjort av forfatter av denne oppgaven. Laboratorieingeniører på mikrobiologisk laboratorium ved Nofima opparbeidet bakterieprøver av bakterier isolert fra bedrift B og inkubert anaerobt, og alle bakterieisolater fra bedrift A.

Utvalgte bakteriekolonier fra jernagarskålene ble plukket med en podeøse (1 µl Clear Incolore, Nunc™, Danmark) og inokulert i 50 µl 1*Tris/ EDTA (TE)- buffer i PCR- plate (0,2 ml Semi-skirted 96- well PCR- plate, Thermo Scientific, UK). Ved plukking ble koloniene beskrevet og de fikk et individuelt nummer. Med den samme podeøsen ble suspensjonen prikket på jernagarskål med L- cystein og tiosulfat som svovelkilder. Prikkolonien ble merket med samme individuelle nummeret som kolonien den stammet i fra. Jernagarskålene med prikkolonier ble inkubert ved 15 °C i tre til fem døgn, og deretter lagret ved 4 °C for å ha tilgang til- og oversikt over hvilke bakteriekolonier de identifiserte bakteriestammene kom i fra.

Etter overføring av bakteriemateriale til TE- buffer ble PCR- platene påsatt cap- strips (Flat 8 Cap- strips, Thermo Scientific, UK). Prøvene ble så lysert i 10 minutter ved 99 °C, for deretter bli sentrifugert ved 4700 rpm i 3 minutter. Etter sentrifugering ble 30 µl supernatant pipettert fra brønner i PCR- plater og overført til tilsvarende brønner i GreinerU- plater (PS- Microplate 96- well U- shape, greiner bio- one). GreinerU- platene ble så påsatt folie (MicroAmp™ Optical Adhesive Film, Applied Biosystems™, Warrington, UK) og deretter nedfrosset ved - 20°C.

Ved videre arbeid ble GreinerU- platene satt på is for tining. Det ble så laget til PCR- miks som ble pipettert over i brønner til nye PCR- plater. Miksen i hver brønn bestod av 13 µl Dnasefritt H₂O (Sigma- Aldrich, St. Louise, USA), 10 µl 5 Prime HotMastermix som inneholder blant annet DNA polymerase og dNTPs, 0.5 µl av 1µM Mangala F og 0.5 µl av 1µM Mangala R som er primere.

Tabell 1: Sekvenser og størrelse på produkter fra primere Mangala F og Mangala R.

Primer	Sekvens	Størrelse produkt
Mangala F	5'-TCC- TAC- GGG- AGG- CAG- CAG- T-3'	Ca. 466 bp*
Mangala R	5'-GGA- CTA- CCA- GGG- TAT- CTA- ATC- CTG- TT-3'	Ca. 466 bp

*bp= basepar

Det ble overført 1 µl templat fra hver bakterieprøve i GreinerU- platene til PCR- miksen i de nye PCR- platene. PCR- platene ble påsatt cap- strips før en rask sentrifugering, og det ble så kjørt PCR på prøvene i en PCR- maskin (Veriti 96 well Thermal Cycler, Applied Biosystems, Warrington, UK). Betingelsene for PCR- programmet var: aktivering av enzymer, 94 °C i to minutter; denaturering, 94 °C i 30 sekunder; annealing, 60 °C i 30 sekunder; polymerisering, 72 °C i 30 sekunder; fullføring av polymerisering, 72 °C i syv minutter; 4 °C stopp. Trinnene med denaturering, annealing og polymerisering ble utført i 25 sykluser.

3.2.3 Opparbeiding av bakterieprøver til- og utføring av gelelektroforese

Etter utføring av PCR ble PCR- produktene kort sentrifugert og satt på is. Et tilfeldig antall prøver med PCR- produkt ble testet med gelelektroforese for å undersøke om det fantes nok DNA i prøvene til videre arbeid. Det ble tilsatt 2µl Orange mix til like mange brønner i en ny PCR- plate som antall prøver som skulle testes. Det ble pipettert 5 µl av hver av prøvene over i PCR- platen med Orange mix. En ferdig laget 0,7 % agarosegel (Certified™ Molecular Biology Agarose, Bio- Rad Laboratories AB, Oslo, Norge) med støpte brønner og tilsatt GelRed ble plassert i gelelektroforesekar med 0,5* TBE- buffer. Første brønn på hver rad i gelen ble tilsatt 5 µl Standard VI markør, og de resterende brønnene ble tilsatt 6 µl prøve bestående av PCR- produkt og Orange mix. Gelelektroforesen ble utført med 100 volt i 30 minutter. Det ble deretter tatt bilde av gelen ved hjelp av Gel Doc™ EZ Imager (Bio- Rad laboratories AB, Oslo, Norge) og båndstyrken til prøvene ble så vurdert. Tydelige bånd antydte at det var DNA tilstede i prøvene. Var det mange bånd som var svake eller ikke syntes på bildet tydet det på at det ikke var DNA tilstede i prøven, eller at det var for store konsentrasjoner av DNA. Bakterieprøvene ble da fortynnet 1:10 eller 1:100 DNasefritt H₂O før ny tillaging- og tilsetting av PCR- miks, og utføring av ny PCR og gelelektroforese ble gjennomført. Hvis heller ikke dette ga tydelige bånd på bilde måtte nye bakteriekolonier plukkes og suspenderes i 1*TE- buffer før videre arbeid.

3.2.4. Opparbeiding av bakterieprøver til Chain-terminating sekvensering

For å rense PCR- produktene for overflødig primere og nukleotider ble de først kort sentrifugert og satt på is. Nødvendig mengde ExoSap- IT ble regnet ut for å få 2 µl 1:5 fortykning av ExoSap- IT per prøve, altså 1 del ExoSap- IT + 4 deler DNasefritt H₂O. Det ble pipettert 2 µl ExoSap- IT til brønner i ny PCR- plate og deretter ble 5 µl PCR- produkt tilsatt. PCR- platene med ExoSap- IT og PCR- produkt ble kort sentrifugert før kjørt på ExoSap- ITprogram i PCR- maskin. Betingelsene for ExoSap- ITprogram var: 37 °C i 30 minutter; 80 °C i 15 minutter; 4°C stopp, kun en syklus. Ved 37 °C og 80 °C var det ulike enzymer som ble aktivert for rensing av PCR- produkt

Etter utført rensing av PCR- produkt ble det ble laget en mastermix bestående av 1.5 µl Big Dye® Buffer 5x og 1.0 µl Big Dye® v 1.1 standard som inneholdt både merkede ddNTPs og dNTPs, 1.0 µl med 3.2µM Mangala F og 5.5 µl DNasefritt H₂O. Blandingen ble fordelt i brønner i MicroAmp Optical 96- Well Reaction Plate (Thermo Fisher Scientific), og deretter ble 1 µl rensert PCR- produkt tilsatt. Prøvene ble så satt i PCR- maskin med betingelser som var denaturering: 96 °C i 15 sekunder; annealing og polymerisering; 60 °C i 4 minutter; 4 °C hold. 25 sykluser. Platen ble så sentrifugert i ett minutt.

Hver brønn i Optical 96- well platene ble så tilsatt 10 µl XTerminator™ Solution og 45 µl SAM™ Solution for å felle ubrukte primere, nukleotider og reagenser i brønnene. Optical 96- well platene ble så satt på vortexing i 30 minutter ved 1500 rpm, og deretter sentrifugert ved 2500 rpm i to minutter. Prøvene ble deretter sekvensert i maskin (3130XI Genetic Analyzer, Applied Biosystems, Warrington, UK).

3.2.5. Identifisering av bakteriestammer og utforming av fylogenetisk tre for *Shewanella* sp.

Etter sekvensering ble resultatene bearbeidet av laboratorieingeniør ved hjelp av dataprogrammet Sequence Scanner Software V1.0 (Applied Biosystems) der dårlige sekvenser ble fjernet. Sekvensene ble så åpnet i BioEdith (mBio, 2015) der det ble laget sammenstillinger av sekvenser bestående av ca. 370 bp. Det ble deretter utført søk i The Ribosomale Database Project (RDP) (RDP, 2015) med gensekvensene, og bakterieisolatene ble da identifisert på slektsnivå. Resultatene fra søket i RDP ga grunnlag for hvilke bakteriestammer som var av interesse for denne oppgaven.

Gensekvensene til bakteriestammer identifisert som *Shewanella* sp., og som ble valgt ut til videre karakterisering, ble igjen sammenstilt slik at sekvensene bestod av 394 bp hvis gensekvensene var gode nok. Det ble så utført søk ved hjelp av Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) der det ble identifisert hvilke typestammer i GenBank (NCBI, 2015) gensekvensene var mest like. Bakteriestammene med *Shewanella* sp., ble så satt i fylogenetisk tre laget ved hjelp av «Neighbor joining» metoden (Saitou og Nei, 1987) sammen med typestammer fra GenBank. Hvis en eller flere bakteriestamme av *Shewanella* sp., befant seg nærmest en typestamme fra GenBank i det fylogenetisk treet ble det antatt at stammen eller stammene av *Shewanella* sp., var av samme art som typestammen.

De utvalgte bakteriestammene til videre karakterisering ble podet til reagensrør med 10 ml Long and Hammer buljong. Rørene ble så inkubert under risting ved 15 °C i et døgn. Risting av reagensrørene ble gjort for å få mer oksygen ned i buljongen slik at bakteriene ville vokse raskere. Etter endt inkubasjonstid ble 800 µl av den inokulerte løsningen pipettert over til cryorør (Nalgene™ 1 ml long term storage cryogenic tubes, Thermo Scientific). Det ble så tilsatt 200 µl 87% glyserol (Merck, Darmstadt, Tyskland), og cryorørene ble så nedfrosset ved – 80 °C.

For noen stammer ble utføring av PCR og 16S rDNA sekvensering gjentatt hvis resultatene var usikre.

3.2.6 Produksjon av H₂S fra ulike svovelkilder

Ved produksjon av H₂S på jernagar vil det blir dannet jernsulfid som gir sorte bakteriekolonier. De nedfrosne bakteriestammene ble tatt opp og satt på is for tining. Ved hjelp av en podeøse ble stammene strøket ut på jernagarskåler med tiosulfat og L- cystein (JA1). Agarskålene ble så inkubert ved 25 °C i tre døgn. Ved endt inkubasjonstid ble agarskåler med sorte kolonier satt på kjøll ved 4 °C. Fravær av sorte kolonier medførte inkubasjon i ytterligere tre døgn ved 25 °C, altså seks inkubasjonsdøgn totalt. Etter de seks inkubasjonsdøgnene ble koloniene på agarskålene registrert, uavhengig om de var sorte eller ikke.

For å undersøke om produksjon av H₂S fra bakteriestammene var avhengig av hvilken svovelkilde som ble brukt, ble også to andre jernagarer laget; jernagar med tiosulfat men uten L- cystein (JA2) og jernagar uten thiosulfat, men med L- cystein (JA3). Ved hjelp av en podeøse

ble en tilfeldig koloni fra JA1 strøket ut på JA2 og JA3. Agarskålene ble inkubert ved 25°C i tre døgn og sorte kolonier ble registrert.

Det ble gjort to til tre paralleller av forsøket for alle stammene.

3.2.7. Karakterisering og identifisering av bakteriestammer med API 20 NE

I følge API 20 NE (API 20 NE, 2003) sin brukermanual ble det laget cellesuspensjoner av bakteriestammene ved å ta én til fire kolonier fra en stamme og inokulere i 2 ml 0,85 % saltløsning. Cellesuspensjonene skal da være lik 1 McFarland for å få korrekte resultater ved inokulering i API 20 NE - identifiseringssystem. Det ble målt OD₆₀₀ med et spektrofotometer (UV- 1600PC Spectrophotometer, VWR) av 2 McFarland fortynnet til 0,5 McFarland med 0,85 % NaCl- løsning (Sodium Chloride for analysis, Merck, Danmark), og av cellesuspensjonene. Dette ble gjort for å kunne sammenligne cellesuspensjonen og 0,5 McFarland. Tilfredsstilte ikke cellesuspensjonen kravene til 0,5 McFarland ble suspensjonen enten fortynnet med mer saltløsning eller det ble tilsatt mer cellemateriale. For å nullstille spektrofotometeret ble det brukt 0,85% NaCl- løsning.

API- brettene ble preparert i henhold til API 20 NE brukermanual (API 20 NE, 2003).

De konvensjonelle testene i identifiseringssystemet som bakteriestammene ble testet for var: evne til å redusere nitrater (NO₃), produsere indol (TRP), fermentere glukose (GLU), produsere arginin dehydrolase (ADH), produsere urease (URE), hydrolyse med β- glukosidase (ESC), hydrolyse med protease (GEL) og produsere β- galaktosidase.

Bakteriestammene sin evne til å vokse på ulike substrater ble undersøkt med de assimilerende testene i identifiseringssystemet. Vekstsubstratene var: Glukose (GLU), arabinose (ARA), mannose (MNE), mannitol (MAN), N- acetyl, glukosamin (NAG), maltose (MAL), kalium glukonat (GNT), capric acid (CAP), adipic acid (ADI), malat (MLT) og trinatrium citrat (CIT).

Bakteriestammene ble også testet for oksidaseaktivitet. Det ble da brukt Oxidase Strips (Oxoid LTD, Oxoid LTD, Hampshire, England). Cellemateriale fra stammene ble strøket ut på en liten del av stripsen ved hjelp av en pødeøse. Ved fargeforandring til sterk blå eller indigo var testen positiv.

Forsøket med API 20 NE- identifiseringssystem ble gjentatt for utvalgte stammer hvis resultatene var usiker.

Resultatene fra de konvensjonelle og assimilerende testene, og test av oksidaseaktiviteten ble registrert i API- web (BioMérieux, 2015a) for identifisering av bakteriestammene.

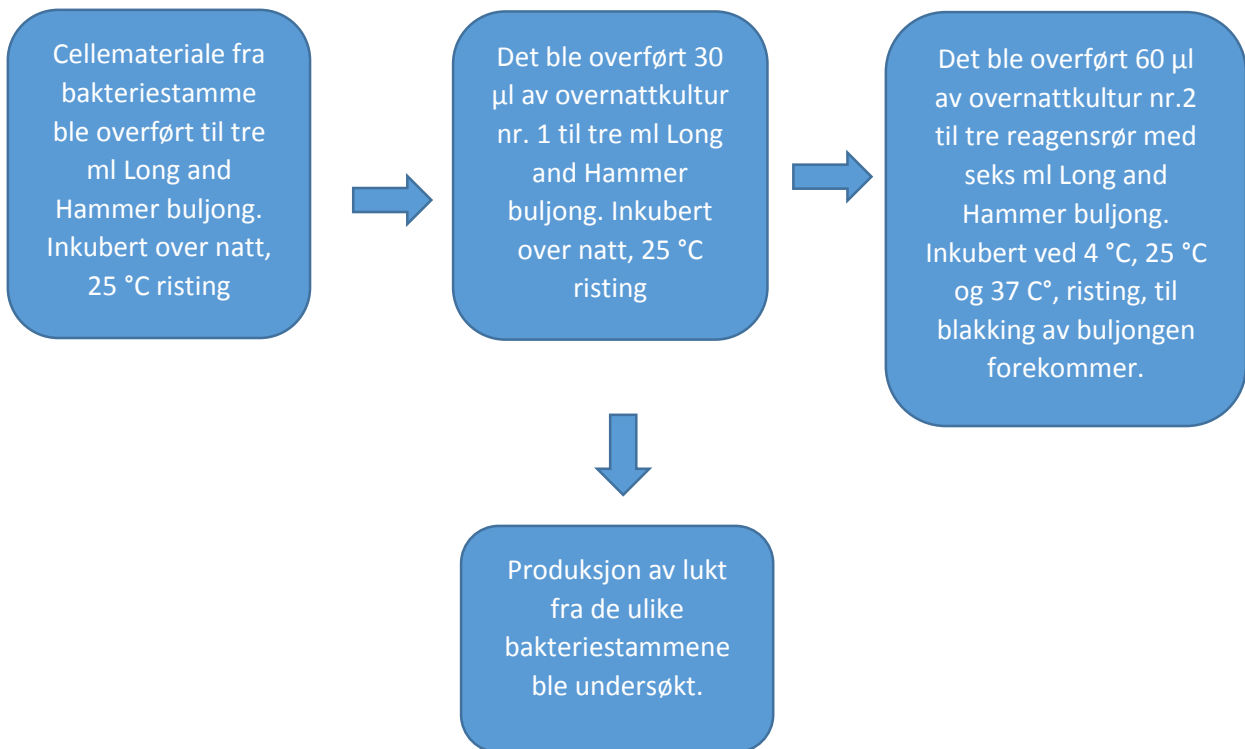
3.2.8. Reduksjon av TMAO til TMA

For å undersøke om bakteriestammene hadde evne til å redusere TMAO til den illeluktende TMA ble det laget to TMAO- medier med ulike fargeindikatorer; en med metylenblått og en med resazurin. Tillaging av TMAO- medium foregikk slik som beskrevet av Gram et al., (1986). I dette forsøket ble det ikke brukt resazurin tabletter slik som i forsøket til Gram et al., (1986), men både resazurin og metylenblått var i pulverform. Serio et al., (2013) lagde TMAO- medium med 0,025% metylenblått, en konsentrasjon av fargeindikator som også ble benyttet i dette forsøket. Etter tillaging av TMAO- medium ble reagensrør fylt med seks ml medium. Bakteriestammene var dagen før blitt inokulert i Long and Hammer buljong og inkubert ved 15 °C med risting over natten. TMAO- mediet ble inokulert med 1 % av overnattekulturen, altså 60 µl. Det ble deretter tilført flytende parafin (Apotekproduksjon AS, Oslo) på toppen av det inokulerte mediet for å få et anaerobt miljø. Rørene ble så inkubert ved 25 °C i tre døgn uten risting, og resultatene ble avlest ved å undersøke fargeendringer i mediet.

Det ble gjort tre paralleller for påvisning av bakteriestammenes evne til å redusere TMAO til TMA i TMAO- medium med metylenblått. Noen bakteriestammer ga ukonsekvente resultater og ble derfor testet en fjerde gang. Undersøkelse av reduksjon av TMAO i medium tilsatt resazurin ble kun utført en gang.

3.2.9. Vekst ved ulike temperaturer og produksjon av lukt

Bakteriestammene ble inokulert i reagensrør med tre ml Long and Hammer buljong. Rørene ble så inkubert ved 25 °C over natt med risting. Dagen etter ble 1 % av overnattekulturen overført til nye reagensrør med tre ml Long and Hammer buljong. Også disse rørene ble inkubert ved 25 °C over natt med risting. Ved endt inkubasjonstid ble det laget til tre nye reagensrør per bakteriestamme med Long and Hammer buljong, denne gangen med seks ml. 1 % av overnattekultur fra andre gangs ompodning ble overført til hvert av de tre nye rørene. De tre nye rørene ble satt på risting på hver sin temperatur: 4 °C, 25 °C og 37 °C. Bakteriestammene sin evne til å vokse ved de ulike temperaturene ble undersøkt hver dag (maksimum 7 døgn) frem til visuell vekst i form av blakking av buljong.

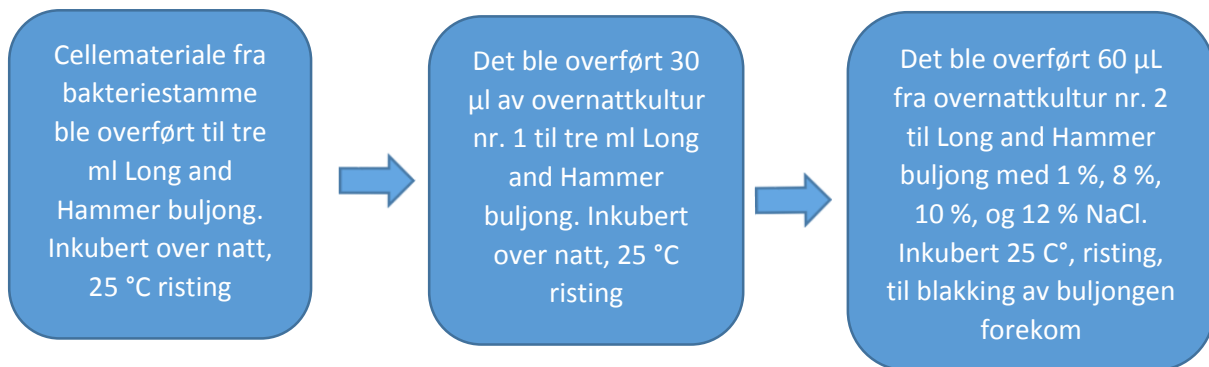


Figur 2: Skjematisk oversikt over vekstforsøk ved ulike temperaturer og produksjon av lukt.

Ved andre gangs ompoding ble bakteriestammenes evne til å produsere lukt undersøkt. Dette ble gjort ved å lukte på rørene etter endt inkubasjonstid. Fra et tidligere sensorisk forsøk på forringelse av laks utført på Nofima, da spesielt med tanke på kvalitetsforringelse fra *Shewanella*, ble disse ordene blitt tatt i bruk for å beskrive lukten som ble produsert: brygge, harsk, fermentert, emmen og ammoniakk. Da denne oppgaven spesielt omhandler H₂S-produksjon fra *Shewanella* og andre fiskebakterier ble også sulfid/ råtne egg tatt i bruk for beskrivelse av lukt.

3.2.10. Vekst i ulike saltkonsentrasjoner

Forsøket ble innledningsvis utført som forsøk 3.2.6. Vekst ved ulike temperaturer og produksjon av lukt, ved to ganger 1 % ompoding av overnattkultur. Det ble deretter preparert fire nye reagensrør per stamme med seks ml Long and Hammer buljong med varierende saltkonsentrasjon. Saltkonsentrasjonene benyttet var 1 %, 8 %, 10 % og 12 %. Alle reagensrør ble inkubert ved 25 °C på risting. Visuell vekst i rørene ble undersøkt hver dag (maksimum 14 dager), og ble indikert ved blakking av buljong.



Figur 3: Skjematisk oversikt over vekstforsøk ved ulike saltkonsentrasjoner.

4. Resultater

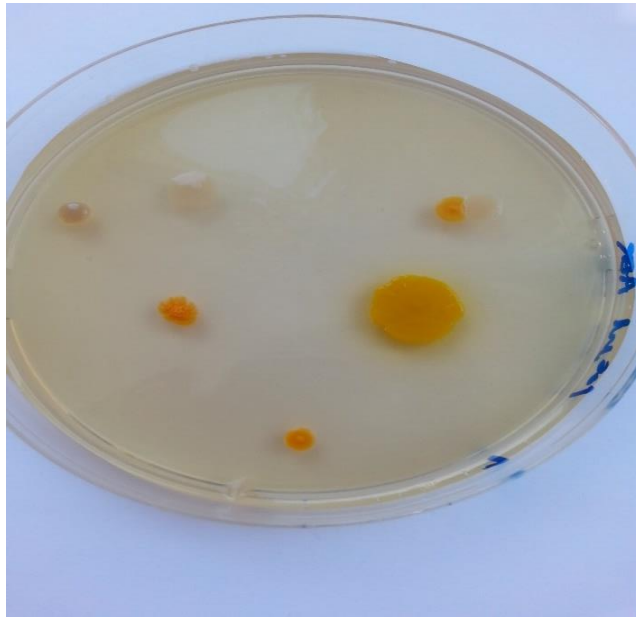
4.1. Isolering og rendyrking av bakteriestammer

Etter uttak av ble bakterieprøver fra anlegg A og B ble prøvene sådd ut på jernagar (med tiosulfat og L- cystein) for isolering av bakteriestammer. I denne oppgaven var det fokus på bakterier som produserte hydrogenulfid, og som da utviklet sorte kolonier ved vekst på jernagar, fortrinnsvis *Shewanella*. Bakteriestammer som ikke dannet sorte kolonier på jernagar, men allikevel ble identifisert som spesifikk forringelsesbakterie var også av interesse. Det ble oppvekst av ulike kolonier på jernagar, både sorte og ikke- sorte. Figur 4a, 4b og 4c viser hvordan skåler med forskjellige kolonier kunne se ut.



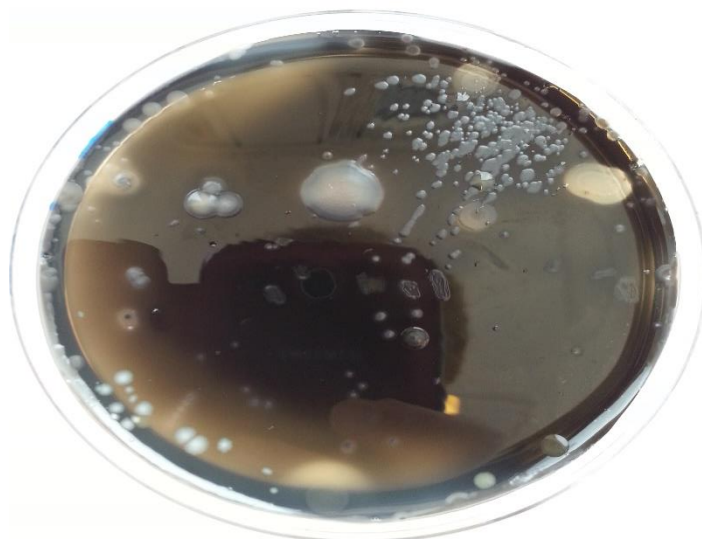
Figur 4a: Jernagarskål med oppvekst av ulike bakterier isolert fra transportbånd i anlegg B.

*15 °C i syv døgn, anaerobt.



Figur 4b: Jernagarskål med oppvekst av ulike bakterier isolert fra sjøvann inn i anlegg B.

*15 °C i syv døgn, aerobt.



Figur 4c: Jernagarskål med oppvekst av ulike bakterier isolert fra transportbånd anlegg B.

*15 °C i syv døgn, anaerobt.

Det ble plukket kolonier til PCR og senere 16S rDNA sekvensering. Der det ikke var mulig å plukke rene kolonier ble cellemateriale plukket og sådd ut på ny jernagarskål (med tiosulfat og L- cystein) for rendyrking. Figur 5 viser to rendyrkede bakteriestammer.



Figur 5: Jernagarskål med to rendyrkede bakteriestammer isolert fra stunner i anlegg B.

*15 °C i 7 døgn, aerobt.

4.2. Identifisering av bakterieslekter

Det ble utført PCR og 16S rDNA sekvensering på et utvalg isolerte bakteriestammer fra anlegg A og B. Stammene ble identifisert på slektsnivå ved å søke med gensekvenser (ca. 370 bp) i The Ribosomal Database Project (RDP, 2015). Til videre arbeid med karakterisering ble det valgt ut 29 bakteriestammer vist i tabell 2.

Tabell 2: Identifiserte stammer isolert fra ulike prøvepunkter og produkter fra anlegg A og B.

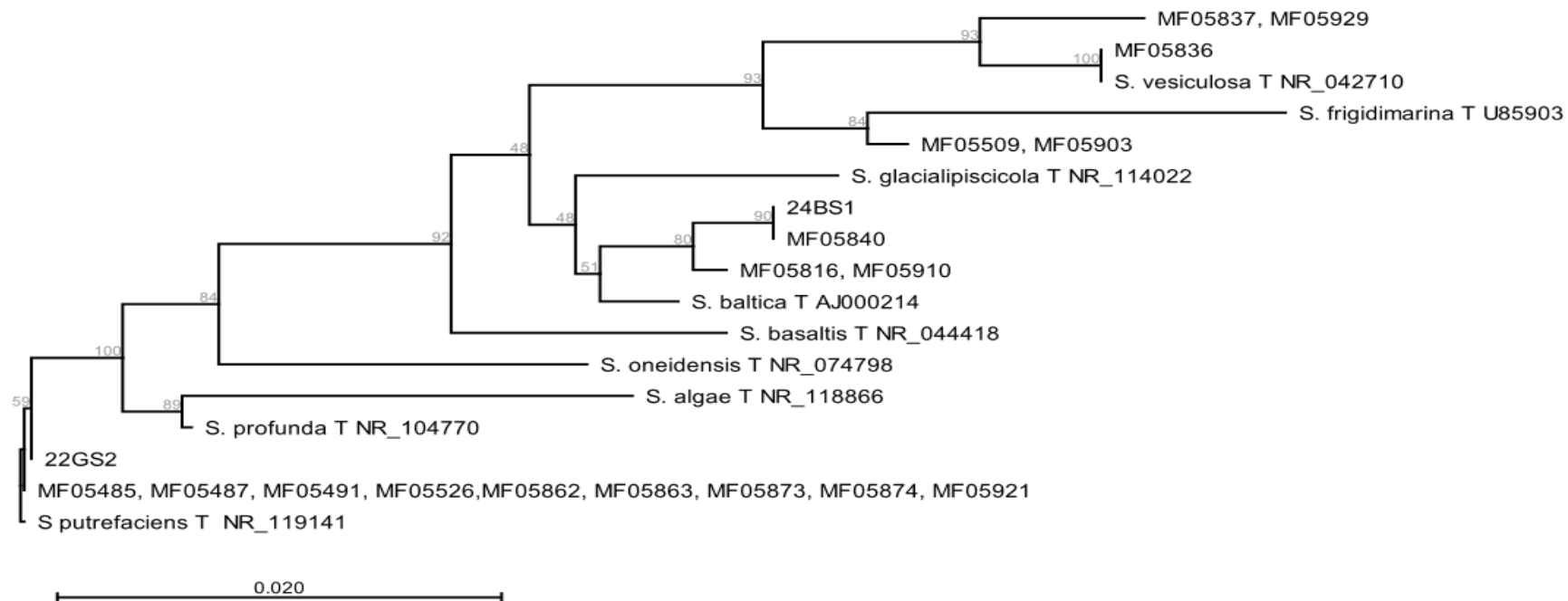
Nummer ¹	Slekt	Prøvetype	Produkt
MF05008 ²	<i>Shewanella</i> sp.	Råvare	Fersk laks
MF05009 ²	<i>Shewanella</i> sp.	Råvare	Fersk laks
MF05485	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Fordelingsbånd
MF05487*	<i>Shewanella</i> sp.	Vann	Sjøvann inn
MF05491	<i>Shewanella</i> sp.	Vann	Sjøvann inn
MF05509	<i>Shewanella</i> sp.	Råvare	Råvare før desliming
MF05526	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Rejekttransportør
MF05811	<i>Aeromonas</i> sp.	Råvare	Filet
MF05816*	<i>Shewanella</i> sp.	Råvare	Filet
MF05822	<i>Shewanella</i> sp.	Råvare	Filet
MF05836*	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Vann kjøletank
MF05837*	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Vann kjøletank
MF05840	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Forlengelsesbånd
MF05849	<i>Aeromonas</i> sp.	Råvare	Filet
MF05850	<i>Aeromonas</i> sp.	Råvare	Fersk laks
MF05862	<i>Shewanella</i> sp.	Råvare	Råvare etter desliming
MF05863	<i>Shewanella</i> sp.	Råvare	Råvare etter desliming
MF05873	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Akselrasjonstransportør
MF05874	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Akselrasjonstransportør
MF05903*	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Vektbånd manuell linje
MF05910	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Kjøletank 3
MF05919	<i>Shewanella</i> sp.	Vann	Vann motstrømskar
MF05921	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Sløyemaskin 4 prismer
MF05929*	<i>Shewanella</i> sp.	Vann	Vann utblødningskar
MF06147	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Stunner
MF06148	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Stunner
MF06149	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Kant renne under stigebånd
MF06150	<i>Shewanella</i> sp.	Hygieneprøve	Drensrør
MF06151	<i>Morganella</i> sp.	Hygieneprøve	Beinnapper

¹ Stammenummer i Nofimas stammesamling. ² MF05008 og MF05009 tidligere isolert fra fersk norskprodusert laks. *Stammer av *Shewanella* sp., som ikke dannet sorte kolonier på jernagar (med tiosulfat og L- cystein).

Tabell 2 viser hvilke stammer som ble valgt ut til videre karakterisering. De fleste sorte koloniene som hadde oppvekst på jernagar (med tiosulfat og L-cystein) ble identifisert som *Shewanella* sp. Det ble derfor valgt ut flest *Shewanella* sp., til karakterisering. Det ble også valgt ut seks stammer av *Shewanella* sp., som ikke produserte sorte kolonier på jernagar. I tillegg ble det valgt ut tre stammer av *Aeromonas* sp., og en stamme med *Morganella* sp., som alle produserte sorte kolonier på jernagar.

4.3. [Fylogenetisk tre for bakteriestammer av *Shewanella* sp.](#)

Med utgangspunkt i gensekvensene fra 16S rDNA sekvensering ble det laget et fylogenetisk tre ved hjelp av «Neighbour Joining» metoden for *Shewanella* sp., vist i figur 6. Figur 6 viser kun 19 av 25 stammer av *Shewanella* sp. da det ikke ble inkludert stammer med usikre sekvenser.



Figur 6: Fylogenetisk tre for stammer av *Shewanella* basert på sekvenser med 394 bp oppnådd med 16S rDNA sekvensering.

* De nærmest beslektede tpeestammene ved BLAST søk er inkludert i figuren med nr. fra Genbank. **Tall i grått er «Bootstrap» verdier.

Stamme 24BS1 = MF05009. *Stamme 22GS2 = MF05008.

I tidligere prosjekt ved Nofima ble Isolat MF05009 (24BS1) og MF05008 (22GS2) isolert fra islagret laks fra syv norske prosesseringsanlegg og deretter identifisert med 16S rDNA sekvensering. Disse stammene er derfor inkludert i figur 6 med stammenavn fra disse tidligere prosjektene. Figur 6 viser at ti stammer hadde i det sekvenserte området størst sekvenslikhet med tpeestammen for *S. putrefaciens* (GenBank: NR_119141), da disse stammene clustret nær denne tpeestammen. Fire stammer hadde størst sekvenslikhet med tpeestammen *S. baltica* (GenBank: AJ000214) i det sekvenserte området, to stammer hadde størst sekvenslikhet med tpeestammen *S. frigidimarina* (GenBank: UB5903), og tre stammer hadde størst sekvenslikhet med tpeestammen *S. vesiculosa* (GenBank NT_042710), der en av stammene viste å være helt lik tpeestammen i det sekvenserte området.

Tabell 3: Gruppering av isolerte stammer i forhold til tpeestamme.

Gruppe	Tpeestamme BLAST- søk	Isolerte stammer*
1	<i>S. putrefaciens</i> T NR_119141	MF05485, MF05487, MF05491, MF05526, MF05862, MF05863, MF05873, MF05874, MF05921, MF05008 (22GS2)
2	<i>S. baltica</i> T AJ000214	MF05816, MF05910, MF05840, MF05009 (24BS1)
3	<i>S. frigidimarina</i> T UB5903	MF05509, MF05903
4	<i>S. vesiculosa</i> T NR_042710	MF05836, MF05837, MF05929
5	<i>Shewanella</i> sp. ¹	MF05822, MF05919, MF06147, MF06148, MF06149, MF06150
6	<i>Aeromonas</i> sp. og <i>Morganella</i> sp. ²	MF05811, MF05849, MF05850, MF06151

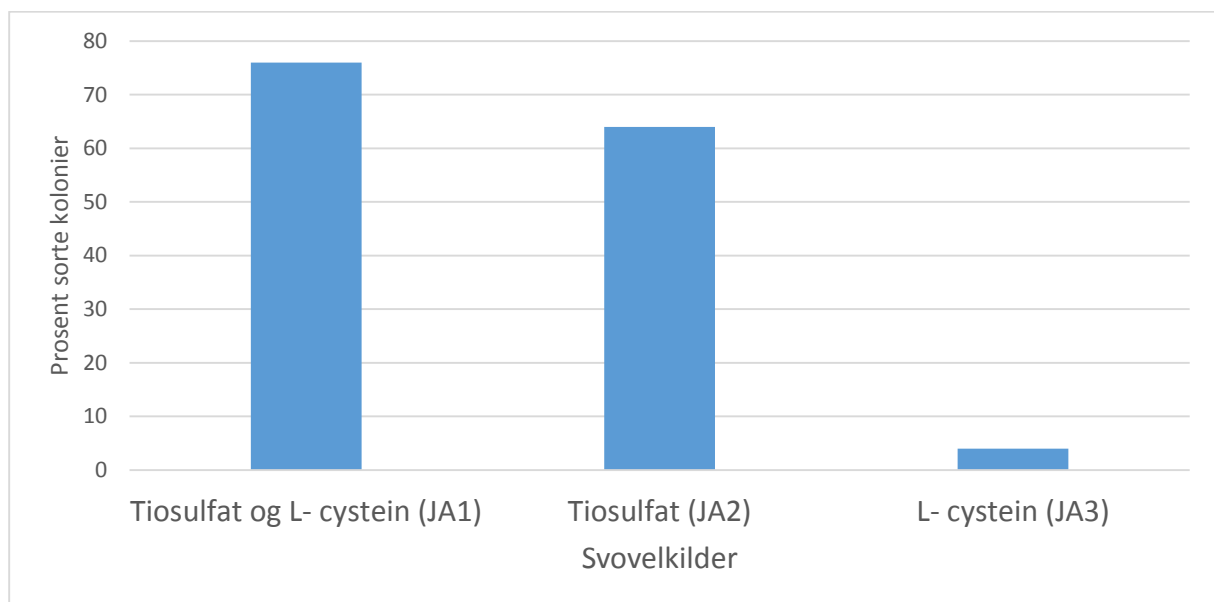
¹Stammer ikke sammenstilt grunnet usikre sekvenser. ²Stammer ikke sammenstilt grunnet andre slekter enn *Shewanella*. *Stammer med størst sekvenslikhet med tpeestamme på samme rad i tabellen.

I tabell 6 er de 19 stammene av *Shewanella* som ble inkludert i fylogenetisk tre inndelt i fire grupper basert på likhet mellom det sekvenserte området til stammene fra 16S rDNA og tpeestammer. De seks stammene av *Shewanella* sp., som ga for usikre sekvenser ved 16S rDNA sekvensering til å bli sammenstilt og ble dermed ikke inkludert i fylogenetisk tre, ble plassert i en egen gruppe (gruppe 5). Også *Aeromonas* sp., og *Morganella* sp., stammene ble satt i egen gruppe (gruppe 6). Disse grupperingene brukes videre i oppgaven.

4.4. Karakterisering av identifiserte bakteriestammer.

4.4.1. Produksjon av H₂S med ulike svovelkilder.

Sorte kolonier er en indikator på bakteriestammens evne til å produsere H₂S som er en forringende egenskap i fisk og fiskeprodukter. For å produsere H₂S kreves det tilstedeværelse av en svovelkilde. Det ble derfor laget tre ulike jernagarer: jernagar med tiosulfat og L- cystein (JA1), jernagar med tiosulfat uten L- cystein (JA2) og jernagar uten tiosulfat med L- cystein (JA3). Alle 29 stammer ble sådd ut på JA1, JA2 og JA3. Andel (%) av *Shewanella* stammer som produserte sorte kolonier (H₂S) på de ulike jernagarene er fremstilt i figur 7. Beskrivelse av kolonienes morfologi produsert på JA1, JA2 og JA3 finnes i vedlegg 3.



Figur 7: Andel (%) sorte kolonier (H₂S) produsert av stammer av *Shewanella* med ulike svovelkilder. *25 °C, tre- seks døgn, aerobt.

Figur 7 viser at det var flest antall stammer av *Shewanella*, ca. 77 %, som produserte H₂S på jernagar med L- cystein og tiosulfat som svovelkilder (JA1). En lavere andel stammer av *Shewanella*, ca. 63 %, produserte H₂S med kun tiosulfat som svovelkilde (JA2), og bare én stamme produserte H₂S med kun L- cystein (JA3) som svovelkilde. Det var seks stammer av *Shewanella* som ikke produserte H₂S på noen av de tre jernagarene.

Tabell 4: Produksjon av H₂S på jernagar med ulike svovelkilder.

Fylogenetisk gruppe	Nummer	Jernagar		
		JA1 ¹	JA2 ²	JA3 ³
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	+**	+	_***
1	MF05485	+	+	-
1	MF05487*	-	-	-
1	MF05491	+	+	-
1	MF05526	+	-	-
1	MF05862	+	-	-
1	MF05863	+	+	-
1	MF05873	+	+	-
1	MF05874	+	+	-
1	MF05921	+	+	-
2 (<i>S. baltica</i>)	MF05009	+	+	-
2	MF05816*	-	-	-
2	MF05840	+	+	+
2	MF05910	+	+	-
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	+	+	-
3	MF05903*	-	-	-
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05836*	-	-	-
4	MF05837*	-	-	-
4	MF05929*	-	-	-
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822	+	+	-
5	MF05919	+	-	-
5	MF06147	+	+	-
5	MF06148	+	+	-
5	MF06149	+	+	-
5	MF06150	+	+	-
6 (<i>Aeromonas</i> sp.)	MF05811	+	+	-
6	MF05849	+	-	+
6	MF05850	+	-	-
6 (<i>Morganella</i> sp.)	MF06151	+	-	-

¹JA1= jernagar med tiosulfat og L- cystein. ²JA2= jernagar med tiosulfat. ³JA3= jernagar med L- cystein. *Ikke- sort *Shewanella*. **+ = produksjon H₂S. ***- = ingen produksjon H₂S. ***25 °C, tre - seks døgn, aerobt.

Tabell 4 viser at ingen stammer fra gruppe 4 (*S. vesiculosa*) produserte H₂S på jernagar med tiosulfat og L- cystein (JA1), tiosulfat (JA2) eller L- cystein (JA3). Alle stammer i gruppe 5 (*Shewanella* sp.) og gruppe 6 (*Aeromonas* sp. og *Morganella* sp.) produserte H₂S på jernagar med tiosulfat og L- cystein. Innad gruppe 1 (*S. putrefaciens*), og 2 (*S. baltica*) produserte de fleste stammene H₂S på jernagar med tiosulfat og L- cystein. På jernagar med tiosulfat produserte de fleste stammene i gruppe 1, 2, og 5 H₂S. På jernagar med L- cystein var kun to stammer fordelt på gruppe 2 og 6 som produserte H₂S. Fra gruppe 1, 2 og 3 (*S. frigidimarina*) var det tre stammer som ikke produserte H₂S på jernagar med tiosulfat og L- cystein. De samme tre stammene produserte heller ikke H₂S på jernagar med tiosulfat eller L- cystein.

4.4.2. Karakterisering og identifisering med API 20 NE

Som en del av karakteriseringen ble alle de 29 bakteriestammene testet med API 20 NE for å undersøke og forhåpentligvis skille mellom deres evne til å metabolisere og vokse på ulike substrater. Tabell 5a og 5b viser resultater for vekst ved konvensjonelle tester. Tabell 6a og 6b viser resultater for vekst ved assimilerende tester og oksidaseaktivitet.

Tabell 5a: Resultater for konvensjonelle tester i API 20 NE.

Fylogenetisk gruppe	Isolat	NO3*	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	+ ¹	²				+	+	
1	MF05485	+					+	+	
1	MF05487**							+	
1	MF05491	+					+	+	
1	MF05526	+					+	+	
1	MF05862	+					+	+	+
1	MF05863	+					+		
1	MF05873	+					+	+	
1	MF05874	+					+	+	
1	MF05921	+					+	+	
2 (<i>S. baltica</i>)	MF05009	+					+	+	
2	MF05816**	+							
2	MF05840	+					+	+	
2	MF05910	+					+	+	
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	+					+	+	
3	MF05903**	+							

¹+ = positiv reaksjon. ²Tom celle = negativ reaksjon. *NO₃= reduksjon nitrater, TRP = indol produksjon, GLU= fermentering glukose, ADH= produksjon arginin dehydrolase, URE= produksjon urease, ESC= hydrolyse ved β- glukosidase, GEL= hydrolyse ved protease, PNPG= produksjon β- galaktosidase. **Ikke- sort *Shewanella*.

Tabell 5b: Resultater for konvensjonelle tester i API 20 NE.

Fylogenetisk gruppe	Isolat	NO3	TRP	GLU	ADH	URE	ESC	GEL	PNPG
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05836**	+ ¹	²				+		
4	MF05837**	+	+				+	+	+
4	MF05929**	+					+		
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822	+					+	+	
5	MF05919	+					+	+	
5	MF06147	+	+		+		+	+	
5	MF06148	+					+	+	
5	MF06149	+				+	+	+	
5	MF06150	+					+	+	
6 (<i>Aeromonas</i> sp.)	MF05811	+	+	+	+		+	+	+
6	MF05849	+	+	+	+		+	+	+
6	MF05850	+		+	+		+	+	+
6 (<i>Morganella</i> sp.)	MF6151	+	+			+	+	+	+

¹+ = positiv reaksjon. ²Tom celle = negativ reaksjon. *NO₃= reduksjon nitrater, TRP = indol produksjon, GLU= fermentering glukose, ADH= produksjon arginin dehydrolase, URE= produksjon urease, ESC= hydrolyse ved β- glukosidase, GEL= hydrolyse ved protease, PNPG= produksjon β- galaktosidase. **Ikke- sort *Shewanella*.

Tabell 5a viser at det var i hovedsak ikke- sorte *Shewanella* i fylogenetisk gruppe 1, 2 og 3 som ga resultater som ikke fulgte trenden for de konvensjonelle testene ved å produsere β -galactosidase (PNPG) og/ eller ikke produsere protease (GEL). Unntaket var isolat MF05862 som også produserte β - galactosidase (PNPG), og MF05863 som ikke produserte protease (GEL). Isolat MF05487 var den eneste bakteriestammen av de totalt 29 bakteriestammene som ikke viste evne til å redusere nitrater (NO_3).

Tabell 5b viser at det var varierende resultater mellom stammene innad de fylogenetiske gruppene 4, 5 og 6. Gruppe 4 bestod av tre stammer av ikke- sorte *Shewanella*, der en av stammene hadde flere positive reaksjoner i API 20 NE enn de to andre. I gruppe 5 var det to stammer som ga flere positive reaksjoner enn de resterende stammene i gruppen. I gruppe 6 ga alle tre stammer av *Aeromonas* sp., like resultater med unntak av indol- produksjon (TRP).

Tabell 6a: Resultater for assimilerende tester i API 20 NE og produksjon av cytochrome oxidase.

Fylogenetisk gruppe	Isolat	GLU*	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	MLT	CIT	OX
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	²				+	+	+				+
1	MF05485	+ ¹				+	+	+		+	+	+
1	MF05487**	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+
1	MF05491		+			+	+	+		+		+
1	MF05526					+		+		+		+
1	MF05862	+	+	+	+	+	+	+		+		+
1	MF05863											+
1	MF05873					+	+			+		+
1	MF05874	+				+	+	+		+		+
1	MF05921	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
2 (<i>S. baltiva</i>)	MF05009	+	+			+	+	+		+	+	+
2	MF05816**											+
2	MF05840	+	+			+	+	+		+	+	+
2	MF05910					+	+	+		+	+	+
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	+	+			+	+	+		+	+	+
3	MF05903**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

¹+ = positiv reaksjon. ²Tom celle = negativ reaksjon. *GLU= vekst glukose, ARA= vekst arabinose, MNE= vekst mannose, MAN= vekst mannitol, NAG= vekst N- acetyl- glukosamin, MAL= vekst maltose, GNT= vekst kalium glukonat, CAP= vekst capric acid, MLT= vekst malat, CIT= vekst trinatrium citrat, OX= produksjon cytochrome oxidase. **Ikke- sort *Shewanella*.

Tabell 6b: Resultater for assimilerende tester i API 20 NE og produksjon av cytochrome oxidase.

Fylogenetisk gruppe	Isolat	GLU*	ARA	MNE	MAN	NAG	MAL	GNT	CAP	MLT	CIT	OX
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05836**	²										+
4	MF05837**	+ ¹		+		+	+			+		+
4	MF05929**											+
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822					+	+	+		+	+	+
5	MF05919	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	MF06147					+	+	+		+	+	+
5	MF06148	+				+	+	+		+	+	+
5	MF06149					+	+	+		+	+	+
5	MF06150	+				+	+	+		+		+
6 (<i>Aeromonas</i> sp.)	MF05811	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+
6	MF05849	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	MF05850	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+
6 (<i>Morganella</i> sp.)	MF6151	+	+			+	+	+		+	+	

¹+ = positiv reaksjon. ²Tom celle = negativ reaksjon. *GLU= vekst glukose, ARA= vekst arabinose, MNE= vekst mannose, MAN= vekst mannitol, NAG= vekst N- acetyl- glukosamin, MAL= vekst maltose, GNT= vekst kalium glukonat, CAP= vekst capric acid, MLT= vekst malat, CIT= vekst trinnatrium citrat, OX= produksjon cytochrome oxidase. **Ikke- sort *Shewanella*.

Tabell 6a og 6b viser at det var varierende resultater for vekst på de assimilerende testene for stammer i alle fylogenetiske grupper. De fleste bakteriestammene viste evne til å vokse på N-acetyl- glukosamin (NAG), maltose (MAL), kalium glukonat (GNT) og malat (MLT). Alle stammer produserte cytochrome oxidase (OX) med unntak av stammen av *Morganella* sp., MF06151. Tre ikke- sorte *Shewanella* og en sort *Shewanella*, MF05863, viste ikke evne til vekst på noen av de assimilerende testene.

Resultatene fra API 20 NE ble registrert i APIWeb (BioMérieux, 2015a). I tabell 7 inngår kun stammer som viste homologi på >95 % med bakteriestammer registrert i API 20 NE-databasen. Det ble vist at 9 av de 29 bakteriestammene ga homologi på >95 % med bakteriestammer registrert i API 20 NE- databasen, og disse ble derfor sammenlignet med identifiseringsresultatene oppnådd ved 16S rDNA sekvensering. Bakteriestammen av *Morganella* sp., ble ikke forsøkt identifisert med API 20 NE da *Morganella* tilhører bakteriefamilien *Enterobacteriaceae*, og ifølge BioMérieux sine nettsider er ikke API 20 NE egent for bakterieslekter i denne familien (Gram og Huss, 2000; BioMérieux, 2015b).

Tabell 7: Sammenligning mellom identifisering av bakteriestammer gjort ved 16S ribosomal DNA sekvensering og homologi på >95 % med bakteriestammer i API 20 NE- database.

Fylogenetisk gruppe	Stamme	Identifisering ved 16S rDNA ¹	Identifisering ved API 20 NE ²
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05485	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Shewanella putrefaciens</i>
1	MF05487	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
1	MF05526	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Shewanella putrefaciens</i>
1	MF05862	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Rhizobium radiobacter</i>
1	MF05873	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Shewanella putrefaciens</i>
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05837	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Vibrio alginolyticus</i>
5 (<i>Shewanella</i> sp)	MF05919	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Shewanella putrefaciens</i>
6 (<i>Aeromonas</i> sp.)	MF05811	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas hydrophilia/ caviae</i>
6	MF05850	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas hydrophilia/ caviae</i>
6	MF05849	<i>Aeromonas</i> sp.	<i>Aeromonas hydrophilia/ caviae</i>

¹Sekvenslikhet >98 % med søk på sekvenser fra 16S rDNA i RDP. ²Homologi >95 % ved søk med resultater fra API 20 NE i API 20 NE- database.

Tabell 7 viser at for syv av ti stammer som hadde homologi > 95 % med stammer i API 20 NE-databasen stemte resultatene overens på slektsnivå med identifiseringsresultatene oppnådd ved 16S rDNA sekvensering. For tre stammer, to fra fylogenetisk gruppe 1 (*S. putrefaciens*) og en fra fylogenetisk gruppe 4 (*S. vesiculosa*) stemte ikke identifiseringsresultatene overens.

Bakteriestammene som ikke viste homologi > 95 % med bakteriestammer i API 20 NE-databasen er fremstilt i tabell 8 sammen med identifiseringsresultater fra 16S rDNA sekvensering.

Tabell 8: Sammenligning mellom identifisering av bakteriestammer gjort ved 16S rDNA sekvensering og homologi på < 95 % med bakteriestammer i API 20 NE- database.

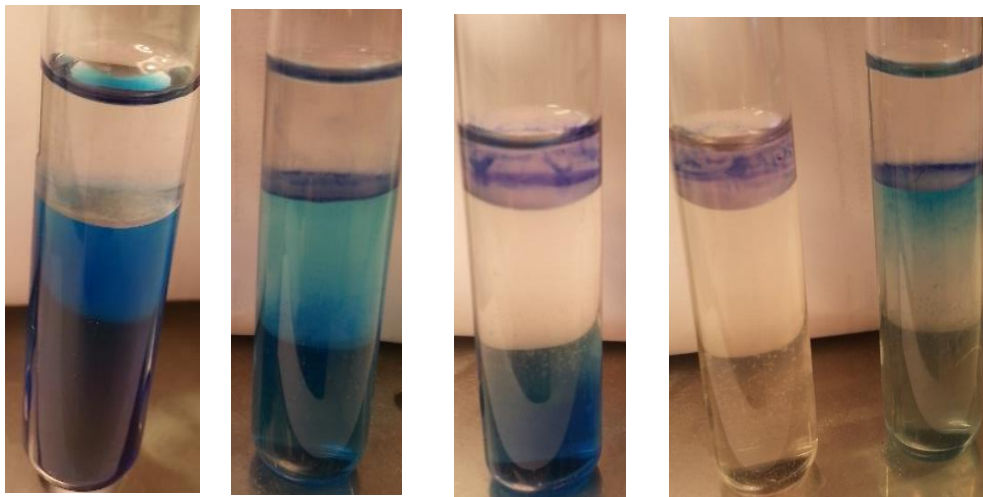
Fylogenetisk gruppe	Stamme	Identifisering ved 16S rDNA ¹	Identifisering ved API 20® NE ²
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
1	MF05491	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Shewanella putrefaciens</i>
1	MF05863	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Pasteurella</i> sp.
1	MF05874	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
1	MF05921	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Pseudomonas luteola</i>
2 (<i>S. baltica</i>)	MF05009	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
2	MF05816	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Pasteurella</i> sp.
2	MF05840	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Shewanella putrefaciens</i>
2	MF05910	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
3	MF05903	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05836	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Pasteurella</i> sp.
4	MF05929	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Pasteurella</i> sp.
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
5	MF06147	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
5	MF06148	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>
5	MF06149	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
5	MF06150	<i>Shewanella</i> sp.	<i>Aeromonas salmonicida</i>

¹Sekvenslikhet >98 % med søk på sekvenser fra 16S rDNA i RDP. ²Homologi på <95 % ved søk med resultater fra API 20 NE i API 20 NE- database.

Tabell 8 viser at innad alle fylogenetiske grupper ble én eller flere stammer identifisert som *Aeromonas salmonicida* eller *Aeromonas hydrophilia/ caviae* ved søk i API 20 NE- databasen med homologi < 95 %. Av 19 stammer ble 11 identifisert på slektsnivå som *Aeromonas*. To stammer som ble identifisert som *Shewanella putrefaciens* ved søk i API 20 NE- databasen ble ved 16S rDNA sekvensering identifisert som *S. putrefaciens* og *S. baltica*.

4.4.3. Reduksjon av TMAO til TMA

Reduksjon av TMAO til TMA er en viktig kvalitetsforringende egenskap for bakterier i fisk og fiskeprodukter, da det medfører vond lukt som forbindes med forringelse av kvalitet. Det ble derfor undersøkt om de 29 bakteriestammene hadde evnen til å redusere TMAO til TMA, og eventuelt hvor mye TMAO som ble redusert. Da dette var en uprøvd metode på mikrobiologisk laboratorium ved Nofima ble det testet to ulike fargeindikatorer i forsøket: metylenblått og resazurin. I TMAO- medium med resazurin var det lite fargeendring som ble observert etter inokulering av bakteriestammene og inkubering (25 °C, 3 døgn, anaerobt). Resultatene for reduksjon av TMAO- medium med resazurin finnes i vedlegg 4. Ved reduksjon av TMAO til TMA i medium med metylenblått ble det observert fargeendring fra mørk blå til lys blå eller blankt medium. Det ble brukt et skaleringsystem fra 0 til 3, der 0 var ingen fargeendring og 3 varierte mellom lys blå til blank, basert på visuell avlesning (Figur 8).



Figur 8: Eksempler på reduksjon av TMAO til TMA i medium med metylenblått.

Figur 8 viser fem eksempler på endring av farge i medium ved reduksjon av TMAO til TMA. Reduksjonen øker fra venstre til høyre, der røret helt til venstre scoret 0 da det var ingen fargeendring, og de to siste TMAO- rørene til høyre ble vurdert å ha samme grad av TMAO-reduksjon (score 3). Den øverste fasen i alle fem TMAO- rør var glyserol. Av ukjente grunner

ble det i flere TMAO- rør dannet to faser under fasen med glyserol. I noen tilfeller var det mørkest farge i bunnen av TMAO- røret, i andre var den mørke fargen øverst i TMAO- røret (under glyserolen). Ett godt eksempel er tredje TMAO- rør til høyre i figur 8 der den øverste fasen er glyserol (med litt blåfarge), den midterste fasen er blank, og den nederste fasen er mellomblå.

Resultatene for TMAO- reduksjon for alle 29 bakteriestammer viste dårlig reproduertbarhet. Forsøket ble derfor gjort tre til fire ganger per stamme. Alle resultater for TMAO- reduksjon i medium med metylenblått som fargeindikator finnes i vedlegg 4. Gjennomsnittlig TMAO- reduksjon er fremstilt i tabell 9.

Tabell 9: TMAO- reduksjon for bakteriestammer i medium med metylenblått som fargeindikator.

Fylogenetisk gruppe	Stamme	TMAO- reduksjon ¹
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	2-3**
1	MF05485	2-3
1	MF05487*	2
1	MF05491	3
1	MF05526	2-3
1	MF05862	1
1	MF05863	0
1	MF05873	1-2
1	MF05874	3
1	MF05921	3
2 (<i>S. baltica</i>)	MF05009	0
2	MF05816*	0
2	MF05840	3
2	MF05910	0-1
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	0
3	MF05903*	1
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05836*	0
4	MF05837*	0
4	MF05929*	0
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822	0-1
5	MF05919	0-1
5	MF06147	0-1
5	MF06148	2-3
5	MF06149	0-1
5	MF06150	3
6 (<i>Aeromonas</i> sp.)	MF05811	2
6	MF05849	3
6	MF05850	2
6 (<i>Morganella</i> sp.)	MF06151	3

¹ Gjennomsnitt fire forsøk. *Ikke- sorte *Shewanella*. **0= ingen reduksjon, 1= lite reduksjon, 2 = noe reduksjon, 3 = mye reduksjon. ***25°C, tre døgn, anaerobt.

Tabell 9 viser at det var ulike resultater for reduksjon av TMAO mellom gruppene 1-6. De fleste stammene i gruppe 1 (*S. putrefaciens*) og alle stammene i gruppe 6 (*Aeromonas* sp. og *Morganella* sp.) viste evne til å redusere TMAO noe (2) til mye (3). Innad gruppe 2 (*S. baltica*),

3 (*S. frigidimarina*), 4 (*S. vesiculosa*) og 5 (*Shewanella* sp.) viste stammene ingen (0) til lite (1) reduksjon av TMAO. I gruppe 1 var det to stammer som viste ingen til lite evne til å redusere TMAO, og en stamme viste lite til noe evne til reduksjon. Innad gruppe 2 og 5 var det til sammen tre stammer som reduserte TMAO noe til mye.

4.4.4 Vekst ved ulike temperaturer

Ved å vurdere bakteriestammenes evnen til å vokse ved ulike temperaturer kan det være mulig å skille stammenes egenskaper fra hverandre, og vurdere potensialet til vekst på fisk og fiskeprodukter lagret ved ulike betingelser. Vekst ble undersøkt i Long and Hammer buljong ved 4 °C, 25 °C og 37 °C og resultatene er fremstilt i tabell 10. Visuell vekst fremtonet seg som blakking av vekstmediet.

Tabell 10: Tid (døgn) til observert visuell vekst for bakteriestammer ved tre ulike temperaturer (4 °C, 25 °C og 37 °C).

Fylogenetisk gruppe	Navn	Inkubasjonstid (døgn)		
		Veksttemperatur		
		4 °C	25 °C	37 °C
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	- ¹	2d	1d
1	MF05485	3d ²	1d	-
1	MF05487*	3d	1d	1d
1	MF05491	-	2d	-
1	MF05526	-	2d	1d
1	MF05862	-	2d	1d
1	MF05863	3d	2d	1d
1	MF05873	3d	1d	-
1	MF05874	-	2d	1d
1	MF05921	2d	1d	1d
2 (<i>S. baltica</i>)	MF05009	-	2d	1d
2	MF05816*	-	2d	1d
2	MF05840	3d	1d	-
2	MF05910	-	2d	1d
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	-	2d	1d
3	MF05903*	2d	1d	-
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05836*	4d	2d	1d
4	MF05837*	3d	1d	1d
4	MF05929*	3d	1d	1d
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822	2d	1d	-
5	MF05919	-	2d	-
5	MF06147	-	2d	1d
5	MF06148	-	2d	1d
5	MF06149	3d	1d	-
5	MF06150	-	2d	2d
6 (<i>Aeromonas</i> sp.)	MF05811	3d	1d	1d
6	MF05849	3d	1d	1d
6	MF05850	3d	1d	1d
6 (<i>Morganella</i> sp.)	MF06151	3d	1d	3d

¹ - = ingen visuell vekst observert. ² d= antall døgn (maksimum syv) før observert visuell vekst ved blakking av mediet, aerobt. *Ikke- sorte *Shewanella*. **Vekstmedium = Long and Hammer buljong.

Tabell 10 viser at alle 29 bakteriestammer ga visuell vekst ved 25 °C etter ett til to døgn. De fleste bakteriestammene med *Shewanella*, og alle bakteriestammene med *Aeromonas* sp., og *Morganella* sp., ga visuell vekst ved 4 °C og 37 °C etter ett til tre døgn. Innad alle grupper med unntak av gruppe 4 (*S. vesiculosa*) og 6 (*Aeromonas* sp., og *Morganella* sp.) var det variasjoner i vekst ved ulike temperaturer og antall døgn brukt til visuell vekst.

4.4.5. Vekst i ulike saltkonsentrasjoner

Bakteriestammenes evne til å vokse ved ulike saltkonsentrasjoner ble undersøkt for å muligens skille bakteriestammenes egenskaper fra hverandre, og for å vurdere vekstpotensialet i fisk og fiskeprodukter med ulikt saltinnhold. Vekst ble undersøkt i Long and Hammer buljong med 1 %, 8 %, 10 % og 12 % NaCl. Av ukjente grunner var det flere bakteriestammer som ikke ga visuell vekst ved noen av saltkonsentrasjonene i dette forsøket, og de ble derfor ikke undersøkt. Tabell 11 viser vekst av bakteriestammer i ulike saltkonsentrasjoner.

Tabell 11: Vekst av bakteriestammer ved ulike konsentrasjoner av NaCl (1 %, 8 %, 10 % og 12 %).

Fylogenetisk gruppe	Navn	Vekst ved saltkonsentrasjoner			
		1 %	8 %	10 %	12 %
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05487*	+ ¹	+	- ²	-
1	MF05491	+	-	-	-
1	MF05873	+	-	-	-
1	MF05921	+	-	-	-
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	+	-	-	-
3	MF05903*	+	-	-	-
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05837*	+	-	-	-
4	MF05929*	+	-	-	-
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05919	+	-	-	-
5	MF06147	+	-	-	-
6 (<i>Aeromonas</i> sp.)	MF05811	+	-	-	-
6	MF05849	+	-	-	-
6	MF05850	+	-	-	-
6 (<i>Morganella</i> sp.)	MF06151	+	-	-	-

¹+ = visuell vekst. ²- = ingen visuell vekst. *Ikke- sorte *Shewanella*. **Vekstmedium = Long and Hammer. *** 25 °C, maksimum 7 døgn inkubasjonstid, aerobt.

Tabell 11 viser at alle undersøkte stammer ga visuell vekst ved 1 % NaCl. Kun en stamme fra gruppe 1 (*S. putrefaciens*) ga visuell vekst ved 8 % NaCl. Ingen av de undersøkte stammene ga visuell vekst ved 10 og 12 % NaCl.

4.4.6. Produksjon av lukt

Det ble undersøkt om de 29 bakteriestammene produserte lukt etter inokulering i Long and Hammer buljong og inkubert ved 25 °C, aerobt over natt. Da Long and Hammer buljong har en distinkt egenlukt overdøvet dette lukt som eventuelle bakteriestammer produserte. Det er derfor ingen luktnesultater å rapportere.

5. Diskusjon

5.1. Isolering og identifisering av bakterier fra prosesseringsanlegg for laks

Denne oppgaven er en del av et prosjekt der det ble isolert og karakterisert *Shewanella* og andre spesifikke forringelsesbakterier fra ferskt produkt, produksjonsutstyr og sjøvann fra prosesseringsanlegg for laks.

Bakteriestammer fra prosesseringsanlegg for laks ble identifisert på slektsnivå med 16S rDNA sekvensering. Det er mulig å identifisere bakteriestammer på artsnivå med full- lengde sekvensering av 16S molekylet, men det ble ikke gjort i denne oppgaven da det er vanlig å utføre en såkalt «grovidentifisering» på korte gensekvenser (ca. 370 bp) på mikrobiologisk laboratorium ved Nofima.

Det ble isolert og identifisert H₂S- produserende bakterier tilhørende både *Shewanella* og andre bakterieslekter fra produksjonsmiljøet i anleggene. Bakterieslekten *Shewanella* er vist å være en vanlig spesifikk forringelsesbakterie i marine miljøer og på fiskeflora, og da spesielt *S. putrefaciens* og *S. baltica* (Rudi et al., 2004; Gram et al., 1986; Dalgaard, 1995; Vogel et al., 2005). Det ble også identifisert H₂S – produserende stammer av *Aeromonas* sp., og en stamme *Morganella* sp. Disse to bakterieslektene kan bli isolert fra blant annet marine miljøer, fra fersk og kvalitetsforringet fisk (Gennari et al., 1999; Kaznowski, 1998). Det har blitt rapportert stammer av *Aeromonas* sp., og *Morganella* sp., som produserer H₂S under andre forhold enn dyrking av stammer på jernagar tilsatt svovelkilde (Gennari et al., 1999; Abbot et al., 1992). Det ble også identifisert seks ikke- sorte kolonier av *Shewanella* sp., det vil si at de ikke produserte H₂S på jernagar tilsatt svovelkildene L- cystein og/ eller tiosulfat. Det har tidligere blitt observert bakteriestammer av *Shewanella* som ikke produserte H₂S på jernagar tilsatt L- cystein og/ eller tiosulfat, men som allikevel produserte H₂S i andre medier (Bozal et al., 2002; Serio et al., 2013; Gennari et al., 1999; Dalgaard, 1995).

For å kunne undersøke sammenheng mellom karakteriseringsresultater og fylogenetisk slektskap ble det laget et fylogenetisk tre ved hjelp av «Neighbor Joining» metoden for identifiserte stammer av *Shewanella* sp., (Saitou og Nei, 1987). Det var ikke alle bakteriestammer av *Shewanella* sp., som ble inkludert i det fylogenetiske treet da de ikke hadde gode nok gensekvenser. I det fylogenetiske treet grupperte bakteriestammene rundt fire typestammer av *Shewanella*: *S. putrefaciens*, *S. baltica*, *S. frigidimarina* og *S. vesiculosa*.

Det har blitt vist at sekvensering med 16S rDNA ikke skiller mellom nært beslektede bakteriearter (Venkateswaran et al., 1998; Fox et al., 1992). I dette forsøket ble bakteriestammene identifisert med 16S rDNA likhet på > 98 % ved søk i BLAST. Det har også blitt vist at 16S rDNA likhet > 97 % ikke nødvendigvis indikerer at to isolater er av samme art (Venkateswaran et al., 1999), og at ulike stammer av *S. putrefaciens* i GenBank har 16S rDNA likhet helt ned til 94 %, og dette kan sannsynligvis også gjelde andre arter av *Shewanella* (Venkateswaran et al., 1999). Det er derfor mulig at de fylogenetiske gruppene i denne oppgaven er relativt heterogene da noen stammer kan tilhøre andre arter av *Shewanella* enn det det fylogenetiske treet viser. Det har vært stor utvikling innenfor identifisering av *Shewanella*, og mange nye arter har blitt identifisert de siste årene. Det er fremdeles stor heterogenitet innad *Shewanella*-artene, så det kan indikere at det fremdeles er flere arter som ikke har blitt identifisert (LPSN, 2015; Venkateswaran et al., 1999).

Identifisering av bakteriestammene tyder på at *S. putrefaciens* var den mest dominerende H₂S- produserende bakteriearten i produksjonsmiljøene. Det er ikke uventet siden *S. putrefaciens* er vanlig å isolere fra fersk og kvalitetsforringet fisk og fiskeprodukter (Rudi et al., 2004; Gram et al., 1986; Dalgaard, 1995). Det har også blitt vist at *S. putrefaciens* er den arten av *Shewanella* som dominerer på fisk både ved lav (0 °C) og høy (20 °C) temperatur (Chai et al., 1968; Herbert et al., 1971; Jensen og Schultz, 1980; Gram et al., 1986). En grunn til at *S. putrefaciens* ofte dominerer på fisk og fiskeprodukter er at *S. putrefaciens* har evne til å vokse godt ved lave temperaturer (Shewan, 1977). Det ble også vist av Bagge et al., (2001) at *S. putrefaciens* har evne til å feste seg til overflater og dannebiofilm. Under produksjon i prosesseringsanlegg for laks er det kontinuerlig tilføring av blod og slam som er næringsrikt. Lange produksjonsdager gir *S. putrefaciens* god tid til å vokse og danne biofilm som vil tåle stress i form av vask og desinfeksjon, og som da gir større mulighet for å isolere *S. putrefaciens* fra prosesseringsmiljøet (Bagge et al., 2001).

Det var fire bakteriestammer som ble identifisert som *S. baltica*. Det har blitt rapportert at *S. baltica* har en dominerende rolle i fiskeflora på fisk fanget fra det Baltiske hav i løpet av vintermånedene (Vogel et al., 2005). Det ble også isolert bakteriestammer av *S. frigidimarina* og *S. vesiculosa* i dette forsøket. *Shewanella frigidimarina* har tidligere blitt isolert fra bakterieflora på skate fanget i den engelske kanalen, og det har blitt rapportert at den kan vokse ved temperaturer under < 0 °C til 27 °C (Broekaert et al., 2011a; Bowman et al., 1997).

Shewanella vesiculosa har blitt isolert fra fisk lagret i syv til 14 dager på is etter innkjøp fra butikk, og at den er rapportert å kunne vokse ved -4 °C til 30 °C (Broekaert et al., 2011b; Bozal et al., 2009). Det kan være at disse tre bakterieartene ble isolert fra produksjonsmiljøene siden de har alle god evne til å vokse ved lave temperaturer, da isoleringen av bakterier til denne oppgaven foregikk i oktober.

5.2. Produksjon av H₂S fra ulike svovelkilder

Produksjon av H₂S gir illeluktende odører som blir forbundet med kvalitetsforringelse (Gram og Huss, 2000). Det ble observert at produksjon av H₂S i form av sorte kolonier varierte mellom bakteriestammene av *Shewanella* når de ble dyrket på jernagar med L- cystein og/ eller tiosulfat som svovelkilde. De fleste stammene av *Shewanella*, og en stamme av *Aeromonas* sp., MF05811, produserte sorte kolonier både på jernagar med L- cystein og tiosulfat, og på jernagar med kun tiosulfat som svovelkilde. Dette stemmer godt med tidligere observasjoner der de fleste artene av *Shewanella* og *Aeromonas* har vist å produsere H₂S på jernagar med tiosulfat som svovelkilde (Venkateswaran et al., 1999; Abbot et al., 1992). Siden disse bakteriestammene har evne til å bruke tiosulfat til produksjon av H₂S uttrykker bakteriene sannsynligvis det membranbundne enzymet tiosulfat reduktase, da det har blitt rapportert at bakterier som har evne til å redusere tiosulfat til H₂S, og dermed produsere sorte kolonier på jernagar, produserer dette enzymet (Stoffels et al., 2012).

Jernagarskålene ble inkubert ved 25 °C etter utstrykning av bakteriestammer. Det har blitt vist at H₂S- produksjon ved høy temperatur (20 °C) fra bakterier isolert fra fisk ikke blir godt nok detektert ved bruk av kun tiosulfat som svovelkilde, og at det da også må brukes L- cystein til deteksjon av H₂S- produksjon (Gram et al., 1986; Venkateswaran et al., 1999). Dette stemmer godt da en bakteriestamme av *Aeromonas* sp., MF05849, produserte sorte kolonier på jernagar med L- cystein og tiosulfat, og kun L- cystein som svovelkilde. Hadde det kun blitt brukt jernagar med tiosulfat som svovelkilde i dette forsøket ville bakteriestamme MF05849 sannsynligvis blitt karakterisert som en ikke H₂S- produserende bakterie. For stammene av *Shewanella* var det kun bakteriestamme MF05840 som produserte sorte kolonier på jernagar med kun L- cystein som svovelkilde. Det har blitt vist at produksjon av H₂S fra L- cystein som svovelkilde forekommer på grunn av enzymet L- cystein desulfhydrase (Oguri et al., 2012). Det kan indikere at stamme MF05840 og stamme MF05849 var de eneste bakteriestammene i dette forsøket som hadde evne til å produsere enzymet L-cystein desulfhydrase. En mulig

forklaring på at kun to bakteriestammer i dette forsøket ble observert å ha evne til å produsere H₂S fra L- cystein kan være at bakterier fra fisk har liten tilgang på L- cystein. Det har blitt vist at det finnes lite av denne aminosyren i fisk fra både varme og kalde strøk (Mohanty et al., 2014). Det kan indikere at det ikke har vært nødvendig for disse bakteriene å produsere L- cystein desulfhydrase, og at det derfor er få stammer som har denne egenskapen. Ioner av tiosulfat er derimot en kilde til redusert uorganisk svovel som finnes i de fleste miljøer på jorden (Steudel og Steudel, 2010). Det kan da være at de fleste bakterier har evne til å produsere tiosulfat reduktase siden ioner av tiosulfat ofte er tilgjengelig for metabolisering.

Det var tre bakteriestammer av *Shewanella*, en stamme av *Aeromonas* sp., og en stamme av *Morganella* sp., som produserte sorte kolonier kun på jernagar med både L- cystein og tiosulfat som svovelkilder. Det kan indikere at disse bakteriestammene kun har evne til å produsere H₂S når begge svovelkildene tilstede. Det ble ikke funnet tidligere beskrivelser der L- cystein og tiosulfat har påvirkning på hverandre ved produksjon av H₂S fra bakterier, men det kan tyde på at sammen har de effekt som fører til uttrykk av gener i bakterier som koder for L-cysteine desulfhydrase og/ eller tiosulfat reduktase.

Det ble også identifisert seks stammer av *Shewanella* som ikke produserte sorte kolonier på jernagar med verken L- cystein og/ eller tiosulfat som svovelkilde. Det er mulig at disse bakteriestammene ikke uttrykker enzymene L-cysteine desulfhydrase eller tiosulfat reduktase, men det kan heller ikke utelukkes at de kan produsere H₂S under andre betingelser enn betingelsene i denne oppgaven. Det har tidligere blitt rapportert bakteriestammer av *Shewanella* som ikke produserte H₂S på jernagar tilsatt L- cystein og/ eller tiosulfat, men som allikevel produserte H₂S i andre medier som Trippel Sugar Iron –agar (TSI) og TMAO- medium (Bozal et al., 2002; Serio et al., 2013; Gennari et al., 1999; Dalgaard, 1995).

5.3. Karakterisering og identifisering med API 20 NE

5.3.1. Karakterisering

Det ble vist at det var heterogene resultater innad alle fylogenetiske grupper ved undersøkelse av karakteristiske egenskaper med API 20 NE- identifiseringssystem. Denne heterogeniteten vises mer tydelig ved resultatene for de assimilerende testene enn for de konvensjonelle. Også Serio et al., (2013) observerte at det var heterogene resultater innad arter av *Shewanella* ved undersøkelse av bakteriestammer med API 20 NE. Det har blitt observert ved flere

anledninger at stammer av *Shewanella* har heterogene egenskaper, og da spesielt stammer av *S. putrefaciens* (Venkateswaran et al., 1999; Vogel et al., 2005). Ved flere tilfeller var det de ikke – sorte *Shewanella* stammene som skilte seg mest ut da de viste vekst på enten flere eller færre assimilerende tester enn de andre bakteriestammene, men det var også noen sorte-*Shewanella* stammer som skilte seg ut. Mellom bakteriestammene av *Aeromonas* sp., var det også noe variasjon. Det er mulig at det er genetisk variasjon også mellom disse stammene siden de kun er identifisert på slektsnivå.

Fisk inneholder mye nitrogen i form av protein og Ikke- protein nitrogen (Gram og Huss, 2000). Når bakterier har evne til å redusere nitrogenholdige komponenter kan det ha negativ effekt for kvaliteten til fisk, da det kan bli produsert illeluktende odører forbundet med forringelse (Gram og Huss, 2000). Det ble vist at alle de undersøkte bakteriestammene hadde evne til å redusere nitrat/ nitritt. Dermed har alle stammene potensiale til å produsere odører forbundet med kvalitetsforringelse, med unntak av den ikke- sorte *Shewanella* stammen MF05487 i fylogenetisk gruppe 1 (*S. putrefaciens*), som ikke reduserte nitrat/ nitritt. Å redusere nitrogenholdige komponenter er en egenskap alle bakteriestammer av *Shewanella* er rapportert å ha (Venkateswaran et al., 1999).

Det ble også observert at et mindretall bakteriestammer av *Shewanella* fra fylogenetisk gruppe 1, 4 (*S. vesiculosa*) og 5 (*Shewanella* sp.) hadde evne til å produsere indol, arginin dehydrolase, urease og β - galaktosidase. Dette er viktige egenskaper ved forringelse da reduksjon av tryptofan til indol og dannelsen av ammoniakk fra arginin og urease også medfører vonde lukter og smaker forbundet med forringelse av kvalitet (Christoph et al., 1999; Schneider et al., 1998; Hart et al., 2012).

Gelatin er et protein som blir utvunnet fra hud, bein og sener fra både fisk og andre dyr (Warris, 2010). Ved hydrolyse av gelatin kan det bli produsert vonde lukter og smaker som blir forbundet med kvalitetsforringelse. De fleste bakteriestammer av *Shewanella*, alle bakteriestammene av *Aeromonas* sp., og bakteriestammen av *Morganella* sp., viste evne til å produsere gelatinase som hydrolyserer gelatin, og har da mulighet til å forringe fiskeprodukter og andre næringsmidler med gelatin. Det har tidligere blitt observert bakteriestammer av *S. frigidimarina* og *Shewanella* sp., med høy protease- aktivitet ved lave temperaturer (Kulakova et al., 1999), så det kan indikere at det blir mer hydrolyse av gelatin i fiskeprodukter og andre næringsmidler når det er lagret i kjøleskapstemperatur.

Ingen bakteriestammer av *Shewanella* i dette forsøket viste evne til å fermentere glukose, men flere viste evne til å vokse på glukose. I følge identifiseringskriteriene av *Shewanella* til Stenström og Molin (1990), fermenterer ikke bakterier i slekten *Shewanella* karbohydrater som glukose. Det har allikevel blitt observert bakteriestammer av *S. frigidimarina* og *S. baltica* som har denne evnen (Bowman et al., 1997; Vogel et al., 2005). Selv om de fleste artene av *Shewanella* ikke kan fermentere glukose har det allikevel blitt rapportert at flere arter har evne til å bruke glukose til vekst (Satomi et al., 2003; Serio et al., 2013). Siden det er lite karbohydrater i fiskemuskel bør ikke egenskapen til å vokse på glukose bidra til forringelse av kvaliteten til fersk fisk ved lagring, men det kan påvirke fiskeprodukter der det er tilsatt glukose (Gram og Huss, 2000).

5.3.2. Identifisering

Resultatene fra API 20 NE- identifiseringssystem ble registrert i API- web for identifisering av bakteriestammene. Det ble vist at identifisering med API 20 NE og 16S rDNA sekvensering ga motstridende resultater for mange stammer. Identifiseringsresultatene fra API 20 NE med homologi > 95 % må bli tatt i betraktning i forhold til 16S rDNA resultatene, selv om det tidligere har blitt vist at sekvensering av 16S molekylet gir bedre identifiseringsresultater enn API 20 NE (Bosshard et al., 2006). Det var kun ti av 29 bakteriestammer med homologi > 95 % til bakteriestammer i databasen til API- web. Alle API- identifiseringsresultater med homologi < 95 % var for dårlige til å anta at det var korrekt identifisering av bakteriestammene. Bakteriestammer av *Shewanella* sp., og *Aeromonas* sp., har tidligere blitt identifisert på slektsnivå med API 20 NE, og som medførte konklusjon om at fenotypiske identifiseringssystemer som API 20 NE ikke gir nøyaktig identifisering på artsnivå da det kan være mange ulike responser og ulik utførelse (Beaz- Hidalgo et al., 2014).

For syv av de ti bakteriestammene som ble identifisert med homologi > 95 % stemte resultatene fra API 20 NE og 16S rDNA sekvensering overens. Flesteparten av disse var stammer tilhørende fylogenetisk gruppe 1. Det kan komme av at *S. putrefaciens* er den mest kjente arten av *Shewanella* som har blitt studert i årevis, og det kan være at mange stammer av denne arten har blitt identifisert i årenes løp og ligger inne i databasen til API- web.

Tre bakteriestammer, alle fra gruppe 1, ble identifisert ulikt med API 20 NE og sekvensering av 16S molekylet. Dette kan komme av at disse bakteriestammene har karakteristiske

egenskaper som ligner mer på egenskapene til andre bakterieslekter enn *Shewanella*, men at de er genetisk mer like *Shewanella* enn de er til andre bakterieslekter.

De fleste bakteriestammen i denne oppgaven ble identifisert med homologi < 95 % med API 20 NE. Det kan være en mulighet at API 20 NE tradisjonelt har blitt brukt til identifisering av bakterier isolert fra andre miljøer enn fra fiskenæringen, da det kan være at de fleste mikrobiologiske tester som utvikles er mest relevante for human helse (Serio et al., 2013; Venkateswaran et al., 1999; Vogel et al., 2005). Det kan derfor være at API 20 NE ikke er et godt identifiseringssystem for bakterier isolert fra fisk.

Fra hver fylogenetisk gruppe med *Shewanella* ble en eller flere bakteriestammer identifisert som *A. salmonicida* eller *A. hydrophilia/caviae* med homologi < 95 %. Dette kan indikere at de undersøkte stammene av *Shewanella* har egenskaper som er relativt like egenskapene til stammer av *A. salmonicida* og/ eller *A. hydrophilia/caviae*, men at de er genetisk forskjellige. Det er ikke helt uventet at stammer av *Shewanella* og stammer av *Aeromonas* har lignende egenskaper da stammer fra begge slektene har tidligere blitt isolert fra kvalitetsforringet fisk, og de har vist å kunne redusere TMAO og produsere H₂S (Lindeberg, 1997; Gram et al., 1990; Stenström og Molin, 1990).

5.4. Reduksjon av TMAO til TMA

Den luktløse TMAO kan reduseres til den illeluktende TMA som blir forbundet med kvalitetsforringelse i fisk (Gram og Huss, 2000). Det var heterogene resultater innad alle grupper, utenom gruppe 4 (*S. vesiculosa*), som kan tyde på at forringelsespotensialet til bakteriestammer tilhørende samme art varierer. Det var generelt størst reduksjon av TMAO i fylogentisk gruppe 1 (*S. putrefaciens*) og gruppe 6 (*Aeromonas* sp., og *Morganella* sp.). Observasjonene av bakteriestammer som reduserte mye TMAO stemmer godt med andre observasjoner der *S. putrefaciens* er vist å være en viktig spesifikk forringelsesbakterie som reduserer mye TMAO (Rudi et al., 2004; Gennari et al., 1999; Gram et al., 1986). Det har også tidligere blitt observert at stammer av *Morganella* sp. og *Aeromonas* sp. har evne til å redusere TMAO, men det ble ikke rapportert hvor stor reduksjonen var (Gennari et al., 1999; Beaz-Hidalgo et al., 2014).

I fylogenetisk gruppe 2 (*S. baltica*) ble TMAO generelt lite redusert eller ikke redusert i det hele tatt. Den lille reduksjonen av TMAO kan komme av at de inokulerte reagensrørene ble

inkubert ved 25 °C, siden det tidligere har blitt observert bakteriestammer av *S. baltica* som ikke reduserte TMAO ved inkubering ved 25 °C, men ved 4 °C (Serio et al., 2013; Vogel et al., 2005). Det kan indikere at det hadde vært større reduksjon av TMAO ved lavere inkuberingstemperatur. En bakteriestamme i gruppe 2 reduserte mye TMAO. Det indikerer at det er heterogene stammer innad *S. baltica*.

I fylogenetisk gruppe 3 (*S. frigidimarina*) ble ikke TMAO redusert av bakteriestammen med sort *Shewanella*, mens den ikke- sorte *Shewanella* reduserte litt TMAO. Ingen av de tre bakteriestammene med ikke- sorte *Shewanella* i fylogenetisk gruppe 4 reduserte TMAO. Det har tidligere blitt observert bakteriestammer av *S. frigidimarina* og *S. vesiculosa* som reduserte TMAO, men hvor mye TMAO som ble redusert, eller om de observerte stammene var sorte eller ikke- sorte *Shewanella* ble ikke rapportert (Bowman et al., 1997; Bozal et al., 2009). Dette kan indikere at bakteriestammer av sorte og ikke- sorte *Shewanella* har ulikt potensiale for kvalitetsforringelse selv om de er av samme bakterieart.

I fylogenetisk gruppe 5 (*Shewanella* sp.) var det delte resultater da bakteriestammene enten reduserte mye TMAO eller lite/ ingen TMAO. Observasjonene av de to stammene som reduserte mye TMAO stemmer godt med karakterisering av *Shewanella* der alle stammer av *Shewanella* reduserer TMAO (Stenström og Molin, 1990). Det var allikevel flere bakteriestammer som ikke reduserte TMAO, noe også Serio et al., (2013) observere i sitt studie av blant annet *S. baltica* og *S. putrefaciens*.

Metoden brukt for å undersøke bakteriestammenes evne til å redusere TMAO var en uprøvd metode ved mikrobiologisk laboratorium ved Nofima. Bedømmelsen av TMAO- reduksjon foregikk ved å observere fargeendringer i mediet ved slutten av inkubasjonstiden. Det ble gjort flere forsøk med to ulike fargeindikatorer: resazurin og metylenblått. Ved forsøk med resazurin var det svært vanskelig å se fargeforskjeller. Ved forsøk med metylenblått var det enklere å se fargeforskjeller, men metoden var ikke optimal og det var vanskelig å få like resultater med paralleller. Til videre arbeid bør metoden optimaliseres ved å finne bedre metoder for å få oksygenet ut av løsningen enn ved koking da det var veldig usikkert om nok oksygen var ute av løsningen for å få anaerobe forhold. Det har tidligere blitt vist at bakteriestammer av *S. putrefaciens* ikke reduserer TMAO hvis det er ca. 10 % eller mer oksygen tilstede (Boskou og Debevere, 1998). Selv om det ble tilsatt glyserol til løsningen for å gi et anaerobt miljø under inkubering så kan det være at det var for mye oksygen til stede i

løsningen. Utvikling av en standardisert skala med fargeendringer som representerer hvor lite/ mye TMAO har blitt redusert kan også være til hjelp.

5.5. Vekst ved ulike temperaturer

Fisk fra nordiske hav- og vannområder har som oftest en mikrobiell flora som har karaktersitiske evner for vekst som gjenspeiler miljøet de kommer i fra, og som da kan vokse ved temperaturer mellom -2 °C til 12 °C (Adams og Moss, 2008). Lagringstemperaturen for fersk fisk og fiskeprodukter hos både produsent, distributør og forbruker er rundt 4 °C . I dette forsøket ble det observert at alle fylogenetiske grupper hadde en eller flere bakteriestammer som ga synlig vekst ved 4 °C etter to til fire døgn. Det indikerer at i alle grupper er det en eller flere bakteriestammer som kan vokse opp til et signifikant celletall, og som da kan gi forringende effekt ved kjøleskapstemperatur etter få døgn.

Det ble observert at alle bakteriestammer ga visuell vekst ved 25 °C etter ett til to døgn. Dette indikerer at temperatur rundt 25 °C sannsynligvis er optimal veksttemperatur for de fleste stammer. Disse observasjonene stemmer godt med teori der optimal veksttemperatur er rapportert å være rundt 25 °C for de fleste *Shewanella*, *Aeromonas* og *Morganella* (Ivanova et al., 2003; Venkateswaran et al., 1999; Bozal et al., 2002; Vivekanandhan et al., 2003; Kaznowski, 1998). Det var også en eller flere bakteriestammer fra hver fylogenetisk gruppe som ga synlig vekst ved 37 °C etter ett til to døgn. Observasjonene der bakteriestammene vokser fort ved høye temperaturer viser at det er svært viktig å ikke bryte kjølekjeden ved- og etter produksjon, og ved distribusjon av fersk fisk og fiskeprodukter, spesielt i varme måneder og i varme land, da bakteriene fort kan vokse til høye nok celletall til kvalitetsforringelse.

I fylogenetisk gruppe 2 (*S. baltica*) ble det observert at alle bakteriestammer ga visuell vekst ved 25 °C og 37 °C , med unntak av stamme MF05840 som ga ikke visuell vekst ved 37 °C . MF05840 var også den eneste bakteriestammen i denne fylogenetiske gruppen som viste vekst ved 4 °C . Dette stemmer dårlig med teorien om at stammer av *S. baltica* har evne til å vokse ved 4 °C , men ikke 37 °C (Ziemke et al., 1998). Det har blitt vist tidligere at *S. baltica* har en dominerende rolle i mikrobiell flora på fisk lagret på is etter 14 dager (Vogel et al., 2005). I forsøket til Vogel et al., (2005) var bakterietallet høyt, ca. 10^9 cfu/ml først etter 14 dager. Etter syv dager, den samme tiden dette forsøket ble avsluttet, var celletallet i forsøket til Vogel et al., (2005) ca. 10^6 cfu/ml. Selv om det ble brukt høyere temperatur (4 °C) i dette forsøket kan det indikeres at bakteriestammene ikke rakk å nå høye nok celletall til synlig vekst. Det kan

heller ikke utelukkes at bakteriestammene som viste dårlig vekst på jernagar ved 4 °C kan vokse på fisk ved samme temperatur.

Det har tidligere blitt vist at psykrotolerante stammer av *M. morganii* kan produsere histamin ved 5 °C i fiskekjøtt (Emborg og Dalgaard, 2006) Det ble observert i dette forsøket at bakteriestammen med *Morganella* sp., ga vekst ved 4 °C, noe som kan tyde på at denne bakteriestammen er psykrotolerant. Selv om det har blitt observert produksjon av histamin fra *M. morganii* i laks ved både 4 °C, 25 °C og 37 °C var produksjonen liten i forhold til histaminproduksjon i andre fiskearter som makrell (Kim et al., 2006). Det kan indikere at hvis den undersøkte bakteriestammen av *Morganella* sp., er en histaminproduserende stamme så er det liten sannsynlighet for at den produserer nok histamin i laks til at det kan være en fare for forbrukere.

5.6. Vekst i ulike saltkonsentrasjoner

Mange fiskeprodukter blir tilsatt salt for bedre smaksopplevelse, og for å redusere vannaktiviteten i produktet og dermed hemme mikrobiell vekst (Hemmer et al., 2001). Det ble observert at to eller flere bakteriestammer fra hver fylogenetisk gruppe ga synlig vekst i 1 % NaCl, men at ingen stammer ga synlig vekst i 10 % eller 12 % NaCl. Unntaket var gruppe 2 (*S. baltica*) der ingen stammer viste vekst i 1 % NaCl eller i de øvrige saltkonsentrasjonene. Den ikke- sorte *Shewanella*, MF05487 fra gruppe 1 (*S. putrefaciens*), var den eneste undersøkte stammen som viste vekst i 8 % NaCl.

Det har tidligere blitt rapportert at bakteriestammer av *S. putrefaciens*, *S. baltica*, *S. frigidimarina* og *S. vesiculosa* kan vokse ved ulike saltkonsentrasjoner, men alle fire artene kan vokse i 6 % NaCl (Bowman et al., 1997; Venkateswaran et al., 1999; Bozal et al., 2009; Vogel et al., 2005). Det har også blitt rapportert at bakteriestammer av *Aeromonas* sp., og *Morganella* sp., kan vokse i 4 % NaCl (Vivekanandhan et al., 2003; Emborg et al., 2006). Den observerte evnen til vekst i 1 % men ikke 8 % NaCl indikerer at de undersøkte bakteriestammene har evne til å vokse på fisk og fiskeprodukter med et lavt saltinnhold. Det kan også indikere at de undersøkte bakteriestammene har evne til å vokse i saltkonsentrasjoner mellom 1- 8 %. For å karakterisere bakteriestammenes evne til vekst i ulike saltkonsentrasjoner ytterligere, og dermed også karakterisere potensialet for vekst i fisk og fiskeprodukter ytterligere, burde forsøket blitt optimalisert ved å undersøke bakterievekst også i saltkonsentrasjoner som 3 % og 6 %.

Det var flere bakteriestammer som ikke ble undersøkt for vekst i ulike saltkonsentrasjoner da disse stammene ikke viste vekst i overnattekulturer før poding til de ulike Long and Hammer buljongene. Det at bakteriestammene ikke ville vokse i overnattekulturene kan være på grunn av for lang lagringstid av bakteriestammer på agarskål. Agarskålene stod på kjøll (4 °C) mellom forsøkene i denne oppgaven som tok flere måneders arbeid, noe som sannsynligvis ikke var en god lagringsmetode for flere av bakteriestammene over tid. Bakteriestammene burde med jevne mellomrom blitt strøket ut på ny jernagarskål fra nedfrosset tilstand. Noen bakteriestammer viste allikevel evne til å vokse i overnattekulturene, og i de ulike saltkonsentrasjoner. Det er da mulig at disse bakteriestammene er mer hardføre og tåler bedre fysiske påkjenninger.

5.7. Produksjon av lukt

Det var ingen produksjon av lukt fra de ulike bakteriestammene som ble registrert siden Long and Hammer medium brukt i dette forsøket hadde for sterk egenlukt. Det burde isteden blitt brukt et medium uten egenlukt for undersøkelse av luktproduksjon fra bakteriestammene.

6. Konklusjon

Fra produksjonsmiljøet i prosesseringsanlegg for laks ble det isolert flest H₂S- produserende bakterier som ble identifisert å tilhørte bakterieslekten *Shewanella*, og da spesielt arten *S. putrefaciens*. Flere bakteriestammer av *S. putrefaciens* viste stort potensiale for forringelse av kvaliteten til fisk og fiskeprodukter da de produserte illeluktende odører som H₂S og TMA, og også enzymer som kan bidra med ytterligere produksjon av vond lukt og smak. De viste også evne til å kunne vokse til høye celletall ved et bredt spektrum av temperaturer, deriblandt kjøleskapstemperatur, og også ved små konsentrasjoner av salt. Bakteriestammer av *Aeromonas* sp., og *Morganella* sp., som ble isolert fra produksjonsmiljøet viste også stort potensiale for forringelse av kvaliteten til fisk og fiskeprodukter. Ved dårlig hygienisk prosess kan disse bakteriene bli overført fra prosesseringsmiljøet til fiskeprodukt, og kan dermed medføre at holdbarheten reduseres.

Bakteriestammer av *S. putrefaciens* og av andre arter av *Shewanella* som ble isolert fra produksjonsmiljøet viste heterogene egenskaper for potensiale til kvalitetsforringelse. Bakteriestammer som ikke produserte H₂S på jernagar med L- cystein og/ eller tiosulfat som svovelkilder hadde generelt mindre potensiale for kvalitetsforringelse.

7. Forslag til videre arbeid

- Undersøke vekst i ulike saltkonsentrasjoner for bakterier av samme art, men isolert fra ulike miljøer for å finne om opprinnelsesmiljø påvirker vekstegenskaper.
- Undersøke produksjon av hydrogensulfid fra bakteriestammer i andre typer medier eller agarer enn jernagar tilsatt L- cystein og/ eller tiosulfat som svovelkilde.
- Undersøke hvor mye hydrogensulfid som blir produsert fra hver bakteriestamme for å bedre anslå forringede egenskaper.
- Undersøke nærmere forringende egenskaper til ikke- sorte *Shewanella* og finne ulikheter/ likheter med bakteriestammer fra samme art.
- Undersøke forringelsespotensialet til bakteriestammene med poding til fisk med påfølgende sensorisk og kjemisk analyse.

8. Referanser

Abbott, S.L., Cheung, W.K.W., Kroske- Bystrom, S., Malekzadeh, T. og Janda, J.M. (1992) *Identification of Aeromonas strains to the genospecies level in the clinical laboratory*. Journal of Clinical Microbiology, 30 (5): 1262-1266.

Abbot, S.L., Seli, L.S., Catino, M.Jr., Hartley, M.A. og Janda, J.M. (1998) *Misidentification of unusual Aeromonas species as members of the genus Vibrio: a continuing problem*. Journal of Clinical Microbiology, 36 (4): 1103-1104.

Adams, M.R. og Moss, M.O.(2008) *Food Microbiology*. 3 utgave. The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK.

Alhazmi, M.I. (2015) *Isolation of Aeromonas spp. from food products: Emerging Aeromonas infections and their significance in public health*. Journal of AOAC International, 98 (4): 927-929.

API 20 NE (2003). «*Identification of non- enteric, gram- negative rods (API 20 NE)*». Hentet 10 september 2015.

http://microbiology.mtsinai.on.ca/manual/tech/tech04_03.pdf

Applied Biosystems. (2015) «*Sequence Scanner Software V1.0*». Hentet 7 august 2015.

<https://products.appliedbiosystems.com/ab/en/US/adirect/ab?cmd=catNavigate2&catID=600583&tab=DetailInfo>

Bagge, D., Hjelm, M., Johansen, C., Huber, I. og Gram, L. (2001) *Shewanella putrefaciens adhesion and biofilm formation on food processing surfaces*. Applied Environmental Microbiology, 67 (5): 2319-2325.

Beaz- Hidalgo, R., Agüeria, D., Latif- Eugenín, F., Yeannes, M.I. og Figueras, M.J. (2014) *Molecular characterization of Shewanella and Aeromonas isolates associated with spoilage of common carp (Cyprinus carpio)*. FEMS Microbiology Ecology, 362 (1): 1-8.

a.BioMérieux. (2015) «*API-web*». Hentet 2 august 2015.

<https://apiweb.biomerieux.com/servlet/Authenticate?action=prepareLogin>

b.BioMérieux. (2015) «*API®*». Hentet 7 september 2015.

<http://www.biomerieux-usa.com/clinical/api>

Boskou, G. og Debevere, J. (1998) *In Vitro study of TMAO reduction by Shewanella putrefaciens isolated from cod fillets packed in modified atmosphere*. Food Additived and Contaminants, 15 (2): 229-236.

Bosshard, P.P., Zbinden, R., Abels, S., Böddinghaus, B., Altwegg, M. og Böttger, E.C. (2006) *16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE System and the VITEK 2 ID- GNB Card for identification of nonfermenting Gram- negative bacteria in the clinical laboratory*. Journal of Clinical Microbiology, 44 (4): 1359-1366.

Bowman, J.P., McCammon, S.A., Nichols, D.S., Skerratt, J.H., Rea, S.M., Nichols, P.D. og McMeekin, T.A. (1997) *Shewanella gelidimarina sp. nov. and Shewanella frigidimarina sp. nov., novel antarctic species with the ability to produce eicosapentaenoic acid (20:5 ω 3) and grow anaerobically by dessimilatory Fe(III) reduction*. Internstional Journal of Systematic Bacteriology, 47 (4): 1040- 1047.

Bozal, N., Montes, M.J., Miñana- Galbis, D., Manresa, A. og Mercadé, E. (2009) *Shewanella vesiculosa sp.nov., a psychrotolerant bacterium isolated from an Antarctic coastal area*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 59 (2): 336-340.

Bozal, N., Montes, M.J., Tudela, E., Jiménez, F. og Guinea, J. (2002) *Shewanella frigidimarina and Shewanella livingstonensis sp. nov. isolated from Antarctic coastal areas*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52 (1): 195- 205.

Brenner, D.J., Farmer III, J.J., Fanning, G.R., Steigerwalt, A.G., Klykken, P., Wathen, H.G., Hickman, F.W. og Ewig, W.H. (1978) *Deoxyribonucleic acid relatedness of Proteus and Providencia species*. International Journal of Systematic Bacteriology, 28 (2): 269-282.

Brink, A. J., van Straten, A. og van Rensburg, A. J. (1995) *Shewanella (Pseudomonas) putrefaciens bacteremia*. Clinical Infectious Disease, 20 (5): 1327-1332.

a.Broekaert, K., Nosedá, B., Heyndrickx, M., Vlaemyneck, G. and Devlieghere, F. (2011) *The spoilage microbiota of ray (Raja sp.) during ice storage under different conditions: Molecular identification and characterisation of the spoilage potential*. International Journal of Food Microbiology, in preparation.

- b.Broekaert, K., Heyndrickx, M., Herman, L., Devlieghere, F. og Vlaemynck, G. (2011) *Seafood quality analysis: Molecular identification of dominant microbiota after storage on several growth media*. Food Microbiology, 28 (6): 1162-1169.
- Bugge- Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J.N., Johansen, C. og Gram, L. (2003) *The microbial ecology of processing equipment in different fish industries- analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection*. International Journal of Food Microbiology, 87 (3): 239-250.
- Chai, T., Chen, C., Rosen, A. og Levin, R.E. (1968) *Detection and incidence of specific species of spoilage bacteria on fish. II. Relative incidence of Pseudomonas putrefaciens and fluorescent pseudomonas on haddock fillets*. Applied Microbiology, 16 (11): 1738- 1741.
- Christoph, N., Gessner, M., Simat, T.J. og Hoenicke, K. (1999) *Off- flavour in vine and other food products formed by enzymatic, physical and chemical degradation of tryptophane and its metabolites*. Advances in Experimental Medicine and Biology, 467 (85): 659-669.
- Dalgaard, P. (1995) *Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish*. Food Microbiology, 26 (3): 319- 333.
- Derby, H.A. og Hammer, B.W. (1931) *Bacteriology of butter. IV. Bacteriological studies on surface taint butter*. Iowa Agricultural Experiment Station Research Bulletin.
- Devlieghere, F., Lefevre, I., Magnin, A. og Debevere, J. (2000) *Growth of Aeromonas hydrophilia in modified- atmosphere- packed cooked meat products*. Food Microbiology, 17 (2): 185-196.
- DiChristina, T.J. og DeLong, E.F. (1993) *Design and application of rRNA targeted oligo-nucleotide probes of the dissimilatory iron- and manganese- reducing bacterium Shewanella putrefaciens*. Applied Environmental Microbiology, 59 (12): 4152- 4160.
- Easter, M.C. (1982) *Trimethylamine N- oxide reduction by Alteromonas spp.* PhD thesis, Robert Gordon's Institute of Technology, Aberdeen, UK.
- Easter, M.C., Gibson, D.M. og Ward, F.B. (1982) *A conductance method for the assay and study of bacterial trimethylamine oxide reduction*. Journal of Applied Bacteriology, 52 (3): 357-365.

Emborg, J. og Dalgaard, P. (2006) *Formation of histamine and biogenic amines in cold-smoked tuna: an investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine poisoning*. Journal of Food Protection, 69 (4): 897-906.

Emborg, J., Dalgaard, P. og Ahrens, P. (2006) *Morganella psychrotolerans sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56 (10): 2473-2479.

Fellows, P.J. (2009) *Food processing technology*. 3. utgave. Woodhead Publishing Limited, Cambridge UK.

Fernandez-Coll, F. og Pierson, M.D. (1985) *Enumeration of hydrogen sulphide-producing bacteria from anaerobically packaged pork*. Journal of Food Protection, 48 (11): 982-986.

FAO (Food and Aquaculture Organization of the United Nations) (2015). «*Post harvest changes in fish*». Hentet 9 juli 2015. <http://www.fao.org/fishery/topic/12320/en>

Fox, G.E., Wisotzkey, J.D. og Jurtshuk, P. Jr. (1992) *How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity*. International Journal of Systemic Bacteriology, 42 (1): 166-170.

Fulton, M. (1943) *The identity of *Bacterium columbensis* Castellani*. Journal of Bacteriology, 46 (1): 79-82.

Gennari, M., Tomaselli, S. og Cotrona, V. (1999) *The microflora of fresh and spoiled sardines (*Sardina pilchardus*) caught in Adriatic (Mediterranean) sea and stored in ice*. Food Microbiology, 16 (1): 15-28.

Gram, L. og Dalgaard, P. (2002) *Fish spoilage bacteria- problems and solutions*. Current Opinion in Biotechnology, 13 (3): 262-266.

Gram, L. og Huss, H.H. (2000) «*Fresh and Processed Fish and Shellfish*». I *The Microbiological Safety And Quality of Food*, redigert av Lund, B.M., Baird-Parker, T.C. og Gould, G.W. Aspen publisher, Inc. Gaithersburg, Maryland.

Gram, L., Trolle, G. og Huss, H.H. (1986) *Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0 °C) and high (20 °C) temperatures*. International Journal of Food Microbiology, 4 (1): 65-72.

Gram, L., Wedell- Neergaard, C. og Huss, H.H. (1990) *The bacteriology of fresh and spoiling Lake Victorian Nile perch (Lates niloticus)*. International Journal of Food Microbiology, 10 (3-4): 303-316.

Granum, P.E. (2011) *Industrielt renhold*. Oslo: Norges Veterinærhøgskole.

Granum, P.E., O'Sullivan, K. Tomás, J.M. og Ørmen, Ø. (1998) *Possible virulence factors of Aeromonas spp. from food and water*. FEMS- Immunology and Medical Microbiology, 21 (2): 131-137.

Guldager H.S., Bøknæs, N., Østerberg, C., Nielsen, J. og Dalgaard, P. (1998) *Thawed cod fillets spoil ledd rapidly than unfrozen fillets when stored under modified atmosphere at 2 °C*. Journal of Food Protection, 61 (9): 1129-1136.

Gustavsson, J., Cederberg, C., Sonesson, U., van Otterdijk, R., Meybeck, A. (2011) «*Global food losses and food waste: extent causes and prevention*». Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations. Hentet 9 juli 2015.
<http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e.pdf>

Hart, D.J., Hadad, C.M., Craine, L.E. og Hart, H. (2012) *Organic Chemistry- A Brief Course*, 13. utgave. Cengage Learning.

Hemmer, E., Askim, M., Karlsen, H., Lynum, L., Nordeng, A. og Nybraaten, G. (2001) *Næringsmiddellære: råstoff-, produksjon- og ferdigvarekunnskap*. Tenknisk fagskole, næringsmiddelteknikk. Yrkeslitteratur as, Oslo.

Herbert, R.A., Hendrie, M.S., Gibson, D.M. og Shewan, J.M. (1971) *Bacteria active on spoilage of certain sea foods*. Journal of Applied Bacteriology, 34 (1): 41-50.

Ivanova, E.P., Sawabe, T., Gorshkova, N.M., Svetashev, V.I., Mikhailov, V.V., Nicolau, D.V. og Christen, R. (2001) *Shewanella japonica sp. nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51 (3): 1027- 1033.

Ivanova, E.P., Sawabe, T., Zhukova, N. og Gorshkova, N. (2003) *Occurrence and diversity of mesophilic Shewanella strains isolated from the North- West Pacific Ocean*. Systematic and Applied Microbiology, 26 (2): 293-301.

- Jensen, M. og Schultz, E. (1980). *Jernagars anvendelse til friskhedsbestemmelse af fersk fisk*. Dansk Veterinaer Tidsskrift. 63 (8): 314- 318.
- Kaznowski, A. (1998). *Identification of Aeromonas strains of different origin to the genomic species level*. Journal of Applied Microbiology, 84 (3): 423-430.
- Khashe, S. og Janda, J.M. (1998) *Biochemical and patogenic properties of Shewanella alga and Shewanella putrefaciens*. Journal of Clinical Microbiology, 36 (3): 783-787.
- Kim, S.H., Price, R.J., Morrissey, M.T., Field, K.G., Wei, C.I. og An, H. (2006) *Histamine production by Morganella morganii in mackerel, albacore, mahi- mahi, and salmon at various storage temperatures*. Journal of Food Science, 67 (4): 1522-1528.
- Kirov, S.M. og Brodribb, F. (1993) *Exotoxin production by Aeromonas spp. in foods*. Letters in Applied Microbiology, 17 (5): 208-211.
- Kulakova, L., Galkin, A., Kurihara, T., Yoshimura, T. og Esaki, N. (1999) *Cold- active serine alkaline protease from the psycrotrophic bacterium Shewanella starin ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization*. Applied Environmental Microbiology, 65 (2): 611-617.
- Langsrud, S., Møretrø, T., Heir, E., Carlehøg, M., Ådland Hansen, A., Moen, B., Hersleth, M. og Lea, P. (2015) «*Produksjonshygiene og holdbarhet av islagret pre- rigor laksefilet*». Sluttrapport- FHF- prosjekt 900938. Hentet 13 august 2015. <http://www.fhf.no/prosjektdetaljer/?projectNumber=900938>
- Lee, J.S. (1981) «*Selection and growth of seafood under CO₂ enviroment*». I *Proceedings of the First National Conference on Modified and Controlled Atmosphere Packaging of Seafood Products*, redigert av Martin, R.E. National Fisheries Institute, Washington D.C.
- Lerke, P.A., Farber, L. og Adams R. (1967) *Bacteriology and spoilage of fish muscle. 4. Role of protein*. Applied Microbiology, 15 (4): 770- 776.
- Lindeberg, A.M. (1997) *Characterization of Aeromonas, Enterobacteriaceae, Pseudomonas, Bacilli and Lactobacillus spontaneously growing to high numbers in milk, minced meat, fish and cheese*. Lund University Publications.

LPSN. (2015) «*Genus Shewanella*». Hentet 24 august 2015.

<http://www.bacterio.net/shewanella.html>

MacDonnell, M.T. og Colwell, R.R. (1985) *Phylogeny of the Vibrionaceae and recommendarion of two new genera, Listonella and Shewanella*. Systematic and Applied Microbiology, 6 (2): 171- 182.

Mateos, D., Angulta, J., Naharro, G. og Panlagua, C. (1992) *Influence of growth temperature on the production of cellular virulence factors and pathogenicity of environmental and human strains of Aeromonas hydrophilia*. Journal of Applied Bacteriology, 74 (2): 111-118.

mBio (2013). «*BioEdith*». Hentet 7 august 2015.

<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>

McMeekin, T.A. og Patterson, J.T. (1975) *Characterization of hydrogen sulphide- producing bacteria isolated from meat and poultry plants*. Applied Microbiology, 16 (11): 1734- 1737.

Mohanty, B., Mahanty, A., Ganguly, S., Sabkar, T.V., Chakraborty, K., Rangasamy, A., Paul, B., Sarma, D., Mathew, S., Asha, K.K., Behra, B., Aftabuddin, M.D., Debnath, D., Vijayagopal, P., Sridhar, N., Akhtar, M.S., Sahi, N., Mitra, T., Banerjee, P., Paria, P., Das, D., Das, P., Vijayan, K.K., Laxmanan, P.T. og Sharma, A.P. (2014) *Amino acid composition of 27 food fishes and their importance in clinical nutrition*. Journal of Amino Acids, 2014: ID269797.

NCBI (2015). «*GenBank Overview*». Hentet 13 august 2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>

Nogi, Y., Kato, C. og Horikoshi, K. (1998) *Taxonomic studies of deep- sea barophilic Shewanella strains and description of Shewanella violacea sp. nov.* Archives of Microbiology, 170 (5): 331- 338.

NMKL (Nordisk Metodikkomité for Næringsmidler) (2006). Metode nr. 184.

Oguri, T., Schneider, B. og Reizer, L. (2012) *Cysteine catabolism and cysteine desulphydrase (CdsH/STM0458) in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Journal of Bacteriology, 194 (16): 4366-4376.

Popoff, M. (1984) «*Aeromonas*». I *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Volum 1. Redigert av Krieg, N.R. og Holt, J.G. Williams & Wilkins, Baltimore, USA.

RDP (2015). «*The Ribosomal Database Project*». Hentet 11 september 2015. <http://rdp.cme.msu.edu/>

Ross, S.S. og Morris, E.O. (1965) *An investigation of yeast flora of marine fish from Scottish coastal waters and a fishing ground off Iceland*. Journal of Applied Bacteriology, 28 (2): 224-234.

Rudi, K., Maugesten, T., Hannevik, S.E. og Nissen, H. (2004) *Explorative multivariate analysis of 16s rRNA gene data from microbial communities in modified- atmosphere- packed salmon and coalfish*. Applied Environmental Microbiology, 70 (8): 5010- 5018.

Saitou, N. og Nei, M. (1987) *The Neighbor- joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees*. Molecular Biology and Evolution, 4 (4): 406-425.

Satomi, M., Oikawa, H. og Yano, Y. (2003) *Shewanella marinintestina sp. nov., Shewanella schlegeliana sp. nov. and Shewanella sairae sp. nov., novel eicosapentaenoic- acid- producing marine bacteria isolated from sea- animal intestines*. Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 53 (2): 491-499.

Schneider, B.L., Kiupakis, A.K. og Reitzer, L.J. (1998) *Arginine catabolism and the arginine succinyltransferase pathway in Echerichia coli*. Journal of Bacteriology, 180 (16): 4278-4286.

Serio, A., Fusella, G.C., López, C.C., Sacchetti, G. og Paparella, A. (2013) *A survey on bacteria isolated as hydrogen sulfide- producers from marine fish*. Food Control, 39: 111-118.

Shewan, J.M. (1977) *The bacteriology of fresh and spoiling fish and the biochemical changes by bacterial action*. Proceedings of the Conference on the Handling, Processing and Marketing of Thropical Fish. London: 51- 66.

Spanggaard, B., Jørgensen, F., Gram, L. og Huss, H.H. (1993) *Antibiotic resistance against oxytetracycline and oxolinic acid of bacteria isolated from three freshwater fish farms and an unpolluted stream in Denmark*. Aquaculture, 115 (3-4): 195-207.

Stenström, I.M, og Molin, G. (1990) *Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to Shewnella putrefaciens*. Journal of Applied Bacteriology, 68 (6): 601-618.

Steudel, R. og Steudel, Y. (2010) *Derivatives of cysteine related to the thiosulphate metabolism of sulfur bacteria by the multi-enzyme-complex «SOX» - studied by B3LYP-PCM and G3X(MP2) calculations*. Physical Chemistry Chemical Physics, 12 (3): 630- 644.

Stoffels, L., Krehenbrink, M., Berks, B.C. og Uden, G. (2012) *Thiosulphate reduction in Salmonella enterica os driven by the proton motive force*. Journal of Bacteriology, 194 (2): 475-485.

a.UN (United Nations) (2013). «*World population projected to reach 9.6 billion by 2050*». Hentet 9. juli 2015. <http://www.un.org/en/development/desa/news/population/un-report-world-population-projected-to-reach-9-6-billion-by-2050.html>

b.UN (United Nations) (2013). «*Post- harvest food losses estimation- Development of consistent methodology*». Hentet 9 juli 2015.
http://www.fao.org/fileadmin/templates/ess/documents/meetings_and_workshops/GS_SA_C_2013/Improving_methods_for_estimating_post_harvest_losses/Final_PHLs_Estimation_6-13-13.pdf

Van Spreekens, K.J.A. (1974) *The suitability of a modification of Long and Hammers medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products*. Archiv fir Lebensmittelhygiene, 25: 213-219.

Venkateswaran, K., Dohmoto, N. og Harayama, S. (1998) *Cloning and nucleotide sequence of the gyrB gene of Vibrio parahaemolyticus and its application in detection of this pathogene in shrimp*. Applied Environmental Microbiology, 64 (2): 681-687.

Venkateswaran, K., Moser, D.P., Dollhopf, M.E., Lies, D.P., Saffarini, D.A., MacGregor, B.J., Ringelberg, D.B., White, D.C., Nishijima, M., Sano, H., Burghardt, J., Stackebrandt, E. og Nealson, K.H. (1999) *Polyphasic taxonomy of the genus Shewanella and description of Shewanella oneidensi sp.nov*. International Journal of Systematic Bacteriology, 49 (2): 705-724.

Vivekanandhan, G., Savithamani, K. og Lakshmanaperumalsamy, P. (2003) *Influence of pH, salt concentration and temperature on the growth of Aeromonas hydrophilia*. Journal of Environmental Biology, 24 (4): 373-379.

Vogel, B.F., Jørgensen, K., Christensen, H., Olsen, J.E. og Gram, L. (1997) *Differentiation of Shewanella putrefaciens and Shewanella alga on the basis of whole- cell protein profiles, ribotyping, phenotypic characterization, and 16S rRNA gene sequence Aanalysis*. Applied and Environmental Microbiology, 63 (6): 2189-2199.

Vogel, B.F., Venkateswaren, K., Satomi, M. og Gram, L. (2005) *Identification of Shewanella baltica as the most important H₂S- producing species during iced storage of danish marine fish*. Applied and Environmental Microbiology, 71 (11): 6689- 6697.

Willey, J.M., Sherwood, L.M. og Woolverton, C.J. (2009) *Prescott's Principles of Microbiology*. The McGraw- Hill Companies Inc, New York.

Warris, P. (2010) *Meat science: An introductory text*. 2. utgave. CABI Head Office, Oxfordshire, United Kingdom.

Wirtanen, G. og Mattila- Sandholm, T. (1992) *Removal of foodborne biofilms- comparison of surface and suspension test, part 1*. Lebensmittel- Wissenschaft Technologie, 25 (1): 43-49.

Ziemke, F., Höfle, M.G., Lalucat, J. og Rosselló- Mora. (1998) *Reclassification of Shewanella putrefaciens Owen's genomic group II as Shewanella baltica sp.nov*. International Journal of Systematic Bacteriology, 48 (1): 179- 186.

Vedlegg 1. Medier og løsninger

Alle medier ble steriliert med CertoClav (A- 4050, Traun, Østerriket) ved 121 °C i 15 minutter.

1.1. Jernagar med tiosulfat og L- cystein

43.3 g pulver Iron Agar (Oxoid LTD, Hampshire, England) ble løst i 1 liter destillert vann og deretter autoklavert. Løsningen ble avkjølt til 45 °C før 10 ml 0,04% L- Cystein (L- cysteine Hydrochloride Monohydrate, Sigma- Aldrich, Steinheim, Tyskland) ble tilsatt. Løsningen ble så overført til petriskåler og lagret ved 4 °C før bruk.

1.2 Jernagar med tiosulfat uten L- cystein

Løsningen ble laget som i vedlegg 1.1. Jernagar med tiosulfat og L- cystein, men L- cystein ble ikke tilsatt etter autoklaving og avkjøling til 45 °C. Løsningen ble så overført til petriskåler og lagret ved 4 °C før bruk.

1.3 Jernagar uten tiosulfat med L- cystein

Oppskrift etter Gram et al.,(1986).

2% Peptone Bacteriological (Oxoid LTD, Hampshire, England)

0,3 % Lab Lemco Powder (Oxoid LTD, Hampshire, England)

0,3 % Yeast Extract (Oxoid LTD, Hampshire, England)

0,03 % jerncitrat trihydrat (VWR International, Belgia)

0,5 % NaCl (Sodium Chloride for analysis, Merck, Danmark)

0,4 % Nr. 1 bacteriological agar (Oxoid LTD, Hampshire, England)

Reagensene ble løst i destillert vann. Løsningen ble pH- justeret til pH 7,4, autoklavert og avkjølt til 45 °C før 0,04 % av 4 % L- cystein (L- cysteine Hydrochloride Monohydrate, Sigma- Aldrich, Steinheim, Tyskland) ble tilsatt. Løsningen ble så overført til petriskåler og lagret ved 4 °C før bruk.

1.4 TMAO- medium

Oppskrift etter Gram et al., (1986).

2% Peptone Bacteriological (Oxoid LTD, Hampshire, England)

0,3% Lab Lemco Powder (Oxoid LTD, Hampshire, England)
0,3% Yeast Extract (Oxoid LTD, Hampshire, England)
0,03% Jerncitrat trihydrat (VWR International, Belgia)
0,4% NaCl (Sodium Chloride for analysis, Merck, Danmark)
0,4% KH_2PO_4 (Merck, Danmark)
0,4% K_2HPO_4 (Merck, Danmark)
0,025% Metylenblått (Sigma) / Resazurin (Sigma) (Serio et al., 2013)

0,4% Nr. 1 bacteriological agar (Oxoid LTD, Hampshire, England)

0,04% med 4% L- cystein (L- cysteine Hydrochloride Monohydrate, Sigma- Aldrich, Steinheim, Tyskland),

0,5% TMAO, $2\text{H}_2\text{O}$ (Sigma)

Reagensene ble løst i destillert vann. Løsningen ble pH- justert til 6,8 og autoklavert. L- cystein ble tilsatt når løsningen var avkjølt til 45 °C. Løsningen ble så kokt for å fjerne oksygen. Ved ny avkjøling til 45 °C ble TMAO tilsatt. Løsningen ble inokulert straks etter tillaging.

1.5 Long and Hammer buljong

Buljong laget i henhold til NMKL metode nr. 184, men uten gelatin og agar.

0,2 % Peptone Bacteriological (Oxoid LTD, Hampshire, England)

0.001 % K_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Tyskland)

0,1 % NaCl (Sodium Chloride for analysis, Merck, Danmark)

Reagensene ble løst i destillert vann, og deretter pH justeres til $7,0 \pm 0,2$ ved 20- 25 °C. Løsningen ble autoklavert og avkjølt til 45 °C før 2,5 ml 10 % $\text{Fe(III)NH}_4\text{Citrat}$ (Sigma- Aldrich) ble tilsatt. Buljongen ble på flaske i romtemperatur.

Ved forsøk 3.2.7. Vekst ved ulike saltkonsentrasjoner ble mengden NaCl i Long and Hammer buljongen justert slik at det ble laget buljong med 1 % (vanlig oppskrift), 8 %, 10 % og 12 % NaCl.

1.7. Peptonvann

1,0 g Bacto Peptone (Difco)

8,5 g NaCl (Sodium Chloride for analysis, Merck, Danmark)

Reagensene løses i 1000 ml destillert vann og autoklaveres. Oppbevares på flaske i romtemperatur.

1.8. 0,5*TBE- buffer

54g/L Trizma Base (Sigma)

27,5 g/L Boric Acid (Merck)

3.72 g/L EDTA (Invitrogen)

Vedlegg 2. Reagenser

2.1. Orange mix

20 g Ficoll (Sigma)

0,25 g Orange G (Sigma)

100 ml dH₂O

Oppbevares i 1 ml eppendorfrør ved 1 – 20 °C.

2.2 Standard VI

60 µl Standard Marker VI (DNA, Molecular Weight Marker VI 0,15- 2,1 kbp, Roche, Oslo, Norge)

100 µl Orange mix

140 µl dH₂O

Oppbevares i 1 ml eppendorfrør ved 1- 20 °C.

Vedlegg 3. Produksjon av H₂S og kolonimorfologi

Isolerte og identifiserte bakteriestammer (29) fra anlegg A og B ble platespredd på tre jernagarer med ulike sulfidkilder for å undersøke evnen til å produsere hydrogen sulfid som gir utslag som sorte kolonier på jernagar. Beskrivelse av kolonier sin evne til å produsere sorte kolonier, og kolonienes morfologi vises i tabell 12.

Tabell 12: Beskrivelse av bakteriekoloniers morfologi og produksjon av sorte kolonier på ulike jernagarer (15 °C, 5 døgn, aerobt).

Fylogenetisk gruppe	Stamme	JA1*	JA2**	JA3***
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	Gule/ oransje kolonier med sort	Oransje kolonier med sort. Noe blakket overflate	Lys oransje kolonier, ikke sort
	MF05485	Grå/ beige kolonier med sort	Oransje/ beige kolonier med sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF05487	Hvite/ beige kolonier, ikke sort	Små hvite kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort
	MF05491	Gul/ oransje med sort	Oransje kolonier med sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF05526	Rosa/ oransje kolonier med sort	Oransje kolonier, ikke sort	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF05862	Gule/ oransje kolonier med sort	Oransje kolonier, ikke sort	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF05863	Gjennomsiktige/ beigekolonier med sort	Hvite/ beige kolonier, noe sort	Hvite/ beige, ikke sort
	MF05873	Grå/ beige kolonier, ikke sort	Oransje kolonier med sort, noe blakket overflate	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF05874	Oransjekolonier med sort	Oransje/ beige kolonier med sort	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF05921	Hvite/ gule kolonier med sort	Oransje kolonier med sort	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
2 (<i>S. baltica</i>)	MF05009	Grå/ beige kolonier med sort. Svært blakket overflate	Oransje/ beige kolonier med sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF05816	Små grå/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort
	MF05840	Oransje/ beige kolonier med sort. Blakket overflate	Oransje med sort. Blakket overflate	Oransje/ beigekolonier, noe sort
	MF05910	Gjennomsiktige kolonier m sort	Oransje kolonier med sort	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	Grå/ beige kolonier med sort	Oransje/ beige kolonier med sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier, ikke sort

	MF05903	Oransje/ gjennomsiktige kolonier, ikke sort	Beige/ gjennomsiktige kolonier, ikke sort	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05836	Rosa/ oransje kolonier, ikke sort	Mørk oransje kolonier, ikke sort	Lys oransje kolonier, ikke sort
	MF05837	Grå/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort
	MF05929	Små grå/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige, ikke sort
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822	Oransje/ beige kolonier med sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier med sort	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF05919	Oransje/ gjennomsiktige kolonier med sort	Oransje kolonier, ikke sort	Lys oransje kolonier, ikke sort
	MF06147	Grå/ beige kolonier med sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier med sort	Oransje/ mørk beige kolonier, ikke sort
	MF06148	Grå/ beige kolonier med mye sort	Oransje/ beige kolonier med mye sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF06149	Gjennomsiktige kolonier med mye sort	Oransje kolonier med sort	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
	MF06150	Grå/ beige kolonier med sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier med noe sort. Blakket overflate	Oransje/ beige kolonier, ikke sort
6 (<i>Aeromonas</i> sp.)	MF05811	Hvite kolonier med sort	Hvite/ beige kolonier med sort	Hvite/ beige kolonier uten sort
	MF05849	Hvite/ beige kolonier med sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, noe sort
	MF05850	Hvite kolonier med sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort
6 (<i>Morganella</i> sp.)	MF06151	Hvite/ beige kolonier med noe sorte/ grå kjerne	Hvite/ beige kolonier, ikke sort	Hvite/ beige kolonier, ikke sort

*JA1 = jernagar med tiosulfat og L- cystein. **JA2 = jernagar med tiosulfat uten L- cystein.

***JA3 = jernagar uten tiosulfat med L- cystein.

Vedlegg 4. Reduksjon av TMAO

Identifiserte og isolerte bakteriestammer (29) isolert fra anlegg A og B ble undersøkt for sin evne til å redusere trimetylammin N- oksid (TMAO) til trimetylammin (TMA). Endring av farge på inokulert medium etter tre døgn indikerte reduksjon av TMAO. Resultatene for reduksjon av TMAO- medium med metylenblått som fargeindikator er fremstilt i tabell 13, og reduksjon av TMAO- medium med resazurin som fargeindikator er fremstilt i tabell 14.

Tabell 13: Reduksjon av TMAO med metylenblått som fargeindikator (25 °C, tre døgn).

Fylogenetisk gruppe	Stamme	TMAO reduksjon				Gjennomsnitt
		1	2	3	4	
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	-*	++/+++	++/+++		++/+++
1	MF05485	+++	+	++/+++	++/+++	++/+++
1	MF05487	++	+	+		++
1	MF05491	+++	+	+++		+++
1	MF05526	+++	++	++/+++		++/+++
1	MF05862	+	+	+++		+
1	MF05863	-	-	-		-
1	MF05873	+++	-	+ / ++	+ / ++	+ / ++
1	MF05874	-	+++	+++		+++
1	MF05921	+++	++	+++		+++
2 (<i>S. baltica</i>)	MF05009	-	-	-		-
2	MF05816	-	-	-	+++	-
2	MF05840	-	+++	+++		+++
2	MF05910	-	+	- / +		- / +
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	-	-	-		-
3	MF05903	-	+	+ / ++		+
4 (<i>S. vesiculosa</i>)	MF05836	-	-	-		-
4	MF05837	-	-	-		-
4	MF05929	+	-	-		-
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822	-	+ / ++	-	+	- / +
5	MF05919	-	+	- / +		- / +
5	MF06147	-	+	-		- / +
5	MF06148	+++	++	++/+++		++/+++
5	MF06149	-	+	-		- / +
5	MF06150	+++	+++	+++		+++
6 <i>Aeromonas</i> sp.	MF05811	++	+	+++	++	++
6	MF05849	+++	+++	+++		+++
6	MF05850	++	++	++		++
6 <i>Morganella</i> sp.	MF06151	+++	++	+++		+++

*- = ingen reduksjon, + = lite reduksjon, ++ = noe reduksjon, +++ = mye reduksjon.

Tabell 14: Reduksjon av TMAO med resazurin som fargeindikator (25 °C, tre døgn).

Gruppe	Stamme	TMAO- reduksjon
1 (<i>S. putrefaciens</i>)	MF05008	++*
1	MF05485	++
1	MF05487	-
1	MF05491	+
1	MF05526	++
1	MF05862	++
1	MF05863	++
1	MF05873	+
1	MF05874	++
1	MF05921	+
2 (<i>S. baltica</i>)	MF05009	++
2	MF05816	++
2	MF05840	++
2	MF05910	++
3 (<i>S. frigidimarina</i>)	MF05509	++
3	MF05903	++
4	MF05836	++
4	MF05837	++
4	MF05929	++
5 (<i>Shewanella</i> sp.)	MF05822	++
5	MF05919	++
5	MF06147	+
5	MF06148	+
5	MF06149	++
5	MF06150	+
6 <i>Aeromonas</i> sp.	MF05811	-
6	MF05849	++
6	MF05850	++
6 <i>Morganella</i> sp.	MF06151	-

*- = ingen reduksjon, + = lite reduksjon, ++ = noe reduksjon, +++ = mye reduksjon.



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Postboks 5003
NO-1432 Ås
67 23 00 00
www.nmbu.no