



<i>Titill / Title</i>	Hraðvirkar aðferðir til greiningar á saltkærum bakteríum		
<i>Höfundar / Authors</i>	Sigrún Guðmundsdóttir		
<i>Skýrsla Rf / IFL report</i>	15-99	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	17.12.1999
<i>Verknr. / project no.</i>	1367		
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>	Tæknisjóður Rannsóknarráðs Íslands		
<i>Ágrip á íslensku:</i>	<p>Tilgangur þessa verkefnis var að athuga hvort hægt sé að finna hraðvirkari aðferðir til ræktunar á saltkærum bakteríum (roðagerla) í salti, en þær aðferðir sem notaðar eru í dag byggja á ræktun í 14 daga við 35°C. Farnar voru tvær leiðir, í fyrsta lagi að þróa æti sem örvar vöxt roðagerla og í öðru lagi að þróa Polymerase Chain Reaction (PCR) aðferð til að greina roðagerla og áætla magn þeirra. Tilraunir með níu mismunandi æti leiddu í ljós að það ræktunaræti sem notað er í dag gaf bestan vöxt. Nokkur ræktunaræti gáfu hraðan vöxt (4-5 daga) hjá viðmiðunarstofnum en ekki á tveim saltsýnum sem voru notuð. Í ljósi þeirra niðurstaðna var talið að ekki sé æskileg leið að leita að nýjum ætum til ræktunar. Þróuð var því PCR aðferð til greiningar á roðagerlum, notaðir voru prímerar sem voru sérhæfðir fyrir saltkærar bakteríur, og fékkst eitt band (1900 bp) þar sem saltkærar bakteríur voru í sýnum. Hins vegar var styrkleiki bandanna mjög misjafn eftir magni fruma (gat verið dauft þrátt fyrir mikið magn fruma og sterkt þrátt fyrir lítið magn fruma). Því er ekki hægt að nota þessa aðferð til þess að magngreina fjölda baktería í sýnum. Þessa aðferð er hægt að nota sem vísbendingu um hvort roðagerlar séu í salti en hún getur ekki gefið upplýsingar um magn fruma.</p>		
<i>Lykilorð á íslensku:</i>	<i>Roðagerlar, salt, ræktunaræti, PCR</i>		
<i>Summary in English:</i>	<p>The purpose of this project was to try to find a rapid method to identify halophilic bacteria in salt, but conventional method is to culture for 14 days at 35°C. Two ways were tried, first to develop media which stimulate growth of halophilic bacteria and secondly develop Polymerase Chain Reaction (PCR) method to detect halophilic bacteria and estimate their number. Tests with nine different media showed that the media used currently gave best growth. Some media gave rapid growth (4-5 days) for the reference strains but not the two salt samples that were used. Due to these results it was not considered practical to look for new media for culturing. So a PCR method was developed, where specific primers for halophilic bacteria were used and one band (1900bp) developed where samples contained halophilic bacteria. But the intensity of the bands was various depending on the amount of cells (there could be low intensity but high amount of cells and high intensity but low amount of cells). Therefore it is not possible to use this method to quantify numbers of bacteria in samples. It is possible to use this method as an indicator to see there are halophilic bacteria present in salt samples but it can not be used for quantification.</p>		
<i>English keywords:</i>	<i>Halophilic bacteria, salt, culture media, PCR</i>		

Efnisyfirlit

1. INNGANGUR.....	1
2. EFNI OG AÐFERÐIR.....	2
2.1. Tilraunir með mismunandi æti.....	2
2.2. PCR mögnun á saltkærum bakteríum.....	4
2.2.1. DNA einangrun.....	4
2.2.2. PCR mögnun.....	4
2.2.3. Rafdráttur.....	5
3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐA.....	5
3.1. Tilraunir með mismunandi æti.....	5
3.2. PCR mögnun á saltkærum bakteríum.....	9
4. HEIMILDIR.....	11

1. INNGANGUR.

Tilgangur þessa verkefnis er að athuga hvort hægt sé að finna hraðvirkari aðferðir til ræktunar saltkærra baktería en þær aðferðir sem notaðar eru í dag en þær byggja á ræktun í 14 daga við 35°C. En sá tími þykir langur og æskilegt væri að stytta hann.

Saltkærar bakteríur tilheyra ættinni *Halobacteriaceae*. En hugtakið roðagerlar er oft notað sem samheiti yfir þessar bakteríur, en á í raun aðeins við um tiltölulega fáar tegundir út ættkvíslunum *Halobacterium* og *Halococcus* (Vilhelmsson, 1997). Þessar bakteríur eru algengar í grófu sjavar salti og geta skemmt saltaðar próteinríkar afurðir svo sem fisk og valda því að afurðin fær á sig rauðleitan lit. Mikilvægt er að geta greint roðagerla í salti á hraðvirkan hátt þar sem roði myndast á saltfiski ef geymsluhiti fer yfir 8°C og fellur hann þá mjög í verði. Roðagerlar eru mjög próteinsundrandi og mynda margvísleg skemmdarefni svo sem brennisteinsvetni og indól (Chandler *et al.*, 1989) en valda ekki sjúkdómum í mönnum svo vitað sé (Vilhelmsson, 1997).

Gerð var ítarleg heimildaleit, en það voru ekki margar heimildir sem fundust; segja má að flestar heimildirnar hafi verið gefnar út á tímabilinu 1955-1965. Þá hafa saltkærar bakteríur verið mikið skoðaðar, en á seinni tímum hefur ekki mikið verið gert til þess að reyna að stytta ræktunartíma þeirra. Í rannsóknum sem gerðar eru í dag með saltkærar bakteríur er mikið litið til þeirra ensíma sem þær framleiða og eins að nota þær sem "genaferjur".

Samkvæmt gæðastaðli SÍF fyrir sjávarsalt fyrir saltfiskframléiðendur er salt talið gott ef það inniheldur < 100.000 roðagerla/g. Vegna þessara viðmiðunarmarka er mikilvægt að geta áætlað magn roðagerla í sýnum.

Í þessu verkefni var upphaflega markmiðið að skoða þrjár leiðir til þess að stytta tíma til þess að staðfesta roðagerla. Í fyrsta lagi að skoða hvort unnt sé að þróa æti og finna þátt sem örvar vöxt roðagerla. Í öðru lagi að þróa Polymerase Chain Reaction (PCR) aðferð til þess að greina bakteríurnar og áætla magn þeirra. PCR byggir á því að einangra DNA og magna það upp með sérhæfðum prímerum. Ef prímerarnir bindast á DNA þá magnast það upp og band sést við rafdrátt. Í þriðja lagi að skoða

aðrar hraðvirkar aðferðir. Í verkefninu voru mismunandi æti útbúin og ræktunartími skoðaður á þeim og PCR aðferð var þróuð. Þegar þriðji liðurinn var skoðaður nánar var ákveðið að sleppa honum þar sem ekki var talið líklegt að lausn myndist, vegna þess að heimildar leit leiddi ekkert slíkt í ljós og eins hefði þurft að fjárfesta í tækjum til þess að geta framkvæmt þær aðferðir.

2. EFNI OG AÐFERÐIR.

2.1. Tilraunir með mismunandi æti.

Í þessum hluta verkefnisins voru níu ætategundir útbúnaðar, þessi æti voru ýmist flókin ("complex") eða tilbúin ("synthetisk"), en í þeim fyrrnefndu eru öll efni skilgreind en í þeim síðarnefndu eru efni sem voru óskilgreind svo sem peptone, yeast extract og casamino acids.

Eftirfarandi æti voru útbúin:

1. Dussault Lachance Agar (DLA) (Dussault og Lachance, 1952). Magnesium sulphate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 5 g, Magnesium nitrate ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) 1 g, Járn (III) chloride ($FeCl_3 \cdot 7H_2O$) 0.025 g, Pepton 5 g, Glycerol 10 g, Salt (NaCl) 200 g, vatn 1 L. Efnin leyst í vatni, blöndunni skipt til helminga, A og B. Í A er bætt við 10% bactoundanrennudufti (50 gr í 500 ml) og í B er bætt 3% bactoagar (15 gr í 500 ml). A er lítillaga hitaður þar til undanrennuduftið er vel uppleyst. B þarf að sjóða. A og B er síðan blandað saman. pH er stillt á 7.3. Ætið þarf ekki að setja í autoklava er hellt beint á skálar. Þetta æti er það sem er notað til rannsókna á Rf.
2. Halophile agar (HA2%) (Vandersant og Splittstoesser, eds. 1992). Casamino acids 10 g, Yeast extract 10 g, Proteose peptone 5 g, Trisodium citrate 3 g, KCl 2 g, Magnesium sulphate 25 g, NaCl 250 g, agar 20 g, vatn 1 L. pH stillt á 7.2. Ætið var hitað að suðu og sett í autoklava við 121°C í 15 mín.
3. Halophile agar (HA0.5%) með 0,5% agar þar sem að greint hafði verið frá að þessar bakteríur yxu hraðar á æti sem innihélt minna magn af agar (Simmonds og Lamprecht, 1984).
4. Halobacterium medium, DSM æti nr. 97 (DSM97) (DSM catalogue) Casamino acids 7.5 g, Yeast extract 10 g, Trisodium citrate 3 g, KCl 2 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g,

FeSO₄ x 7H₂O 0.05 g, MnSO₄ x H₂O 0.2 mg, NaCl 250 g, agar 20 g, vatn 1 L, pH stillt á 7.4. Ætið var hitað að suðu og sett í autoklava við 121°C í 15 mín.

Þetta æti var notað þar sem að DSM mælti með þessu æti til ræktunar á viðmiðunarstofnunum sem voru keyptir.

5. Medium 1 (M1) fyrir "axenic" ræktun á *Halobacteriaceae*. (Larsen,1981).

Salt 250 g, MgSO₄ x 7H₂O 20 g, KCl 5 g, CaCl₂ x 6H₂O 0.2 g, Yeast extract 5 g, Tryptone 5 g, agar 15 g, vatn 1 L, pH stillt á 7.0. Ætið var hitað að suðu og sett í autoklava við 121°C í 15 mín.

6. Medium 6 (M6) fyrir vöxt Halobacteria og Halococci (Dundas *et al.* 1963). NaCl 240 g, KCl 5 g, MgSO₄ (anhydrous) 5 g, MgCl₂ x 6H₂O 5 g, CaCl₂ x 2H₂O 0.1 g, NH₄Cl 5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, FeCl₂ x 6H₂O 0.005 g, L-Lysine 0.25 g, L-Arginine 0.5 g, L-Proline 0.25 g, L-Valine 0.25 g, L-Methionine 0.1 g, L-Isoleucine 0.25 g, L-Leucine 0.25 g, L-Tyrosine 0.1 g, L-Phenylalanine 0.05 g,

Glutamic acid 15 g (pH var fært upp í 6.8 með NaOH áður en því var bætt í ætið), agar 15 g, vatn 1L, pH stillt á 6.8. Efnunum var öllum blandað saman og suðunni komið upp, síðan var ætið sett í autoklava við 121°C í 15 mín.

7. M6 með viðbættum vítamínum (M6+vit). Í 1 líter af æti var sett biotin 1 µg, folic acid 100 µg, vitamin B12 200 µg og thiamin 1 µg (Gochnauer og Kushner, 1969).

8. DLA með viðbættu 5g/l NH₄Cl og vítamíni.

9. Complex medium of Sehgal an Gibbons (Onishi *et al.* 1965) með viðbótum.

Casamino acids 7,5 g, Yeast extract 10 g, Na-citrate 3 g, KCl 2 g, MgSO₄ * 7H₂O 20 g, NaCl 250 g, FeCl₂ 0,23 g, Agar 15 g, Glycerol 10 g, NH₄Cl 5 g, vatn 1 L, ætið var soðið og pH var stillt á 6.2. Það var síðan sett í autoklava við 121°C í 15 mín.

Á þessi æti voru settir 3 hreinræktaðir stofnar, *Halobacterium salinarium* DSM 670, *Halococcus morrhuae* DSM 1309 og kontrolstofn Rf, auk þess voru tekin 2 saltsýni (saltsýni 1 og saltsýni 2) sem til voru og vitað var að væru menguð af saltkærum bakteríum. Þessi sýni voru tekin í þynningum 1 - 5 nema saltsýnin voru þynnt í þynningu 4. Það var notuð yfirborðssáning á öllum ætum og skálarnar voru ræktaðar við 37°C í fötu með mettaðri saltlausn. Fylgst var með vexti daglega og skráð niður á hvaða þynningum vöxtur var byrjaður yfir 14 daga tímabil.

2.2. PCR mögnun á saltkærum bakteríum.

2.2.1. DNA einangrun.

Saltsýni voru tekin og 25 g vigtuð í erlenmayer flösku, þau voru svo leyst upp í 225 ml af eimuðu vatni. Saltlausnin var síuð í gegnum 0.45 µm filter (Millipore) og filterinn tekinn og skorinn í bita og settur í tilraunaglas með 5 ml af eimuðu vatni. Tilraunaglasíð var síðan hrist mjög vel (a.m.k. 2x 15 sek. á Vortex, Scientific Industries, Inc.) til þess að losa frumurnar af himnunni. Þrjú ml af þessum vökva voru svo skildir niður í skilvindu (Eppendorf Centrifuge 5415 C) í 1.5 ml eppendorf glösum (þannig að það voru teknir 2 x 1.5 ml) í 4 mín við 12000 rpm. Á þessu stigi var byrjað að einangra DNA úr hreinræktum. Flotið var tekið af og 200 µl af 5% Chelex® 100 sett á og vortexað mjög vel. Þessi lausn var síðan incuberuð við 56°C (Techne Hybrideiser HB-1D) í 15 mín, síðan vortexuð aftur og soðin í 10 mín. Þetta er gert til þess að losa DNA úr frumunum og er það nú í lausninni en aðrar frumuleifar eru bundnar við Chelex (Walsh *et al*, 1991). Á þessu stigi má frysta DNAið til notkunar síðar eða halda áfram.

Næst er lausnin skilin niður í eppendorf skilvindu í 4 mín við 12000 rpm, þetta er gert rétt áður en PCR er sett upp, þannig að vökvinn inniheldur DNA templatíð. Hreinræktaðir stofnar sem notaðir voru: *Halobacterium salinarium*, *Halococcus morrhuae*, Rf kontrolstofn, og Gram neikvæðar bakteríur: *Serratia*, *Hafnia alvei*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenosa*, *Pseudomonas I*, *Pseudomonas II*, *Pseudomonas III-IV* og *Shewanella putrefaciens*.

2.2.2. PCR mögnun.

Hvarfblandan innihélt 10 mM Tris-HCl (pH 8.8), 1.5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100, 0.2 µM primerar, 2.5 U DyNAzyme™ DNA polymerase (Finnzymes), 200 µM Oligonukleotide (Amersham Pharmacia), 5 µl DNA template, í 50 µl heildarrúmmáli.

Notuð voru 3 sett af pimerum. Primer 1: 5'-TTC-CGG-TTG-ATC-CTG-CCG-GA-3'
Primer 2: 5'-AGA-GTT-TGA-TCA-TGG-CTC-AC-3'
Primer 3: 5'-GGT-TAC-CTT-GTT-ACG-ACT-T-3'
(Benlloch *et al.* 1996) Primer 4: 5'-ATT-CCG-GTT-GAT-

CCT-GC-3' og Primer 5: 5'-GYT-ACC-TTG-TTA-CGA-CTT-3' (Arahal *et al.* 1996) frá Eurogentec. Þannig er sett A prímerar 1 og 3, B eru prímerar 2 og 3 og C eru prímerar 4 og 5. Hvarflausnin var síðan mögnuð upp þannig að keyrðir voru 35 hringir við 94°C í 1 mín, 55°C í 1 mín 72°C í 2 mín, eftir lokahringinn var lausnin hituð í 72°C í 10 mín (Genius, Techne). Einnig voru sýnin mögnuð þannig að keyrðir voru 30 hringir við 94°C í 30 sek, 55°C í 30 sek, 72°C í 1 mín, eftir lokahringinn var lausnin hituð í 72°C í 10 mín.

2.2.3. Rafdráttur.

Settur var 10 x loading buffer (20% Ficoll 400, 0.1 M Na₂EDTA, (pH 8.0), 1% SDS, 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol) á sýnin og þau síðan rafdregin (Sub Cell® GT í 1% agarose (I.D.NA agarose, FMC bioproducts) geli við 25V (Electrophoresis power supply EPS 500/400, Pharmacia) yfir nótt og gelið myndað í GelDoc 2000 (BioRad) og myndin geymd sem TIFF skrá.

Öll sýni voru tvítekin.

3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐA.

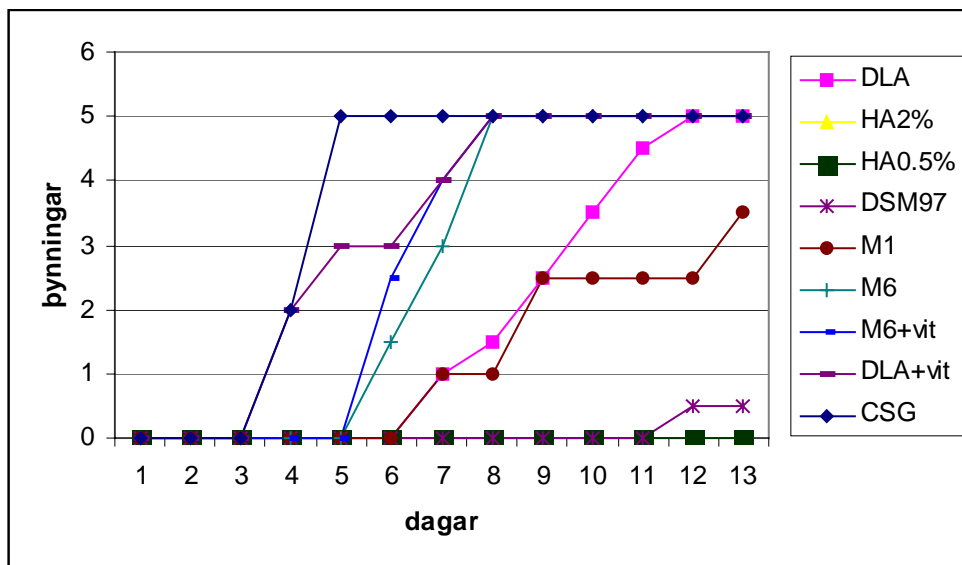
3.1. Tilraunir með mismunandi æti.

Vöxtur hvers stofns á ætunum var skráður þegar hann kom fram á fyrstu þynningu og svo áfram á hvaða þynningu var vöxtur. Í upphafi var ætlunin að telja fjölda kólónía á skálunum en vegna þess hve rakar þær voru og vöxturinn oft lítill var ekki hægt að telja nema á lokadegi og var talið í mestu þynningu.

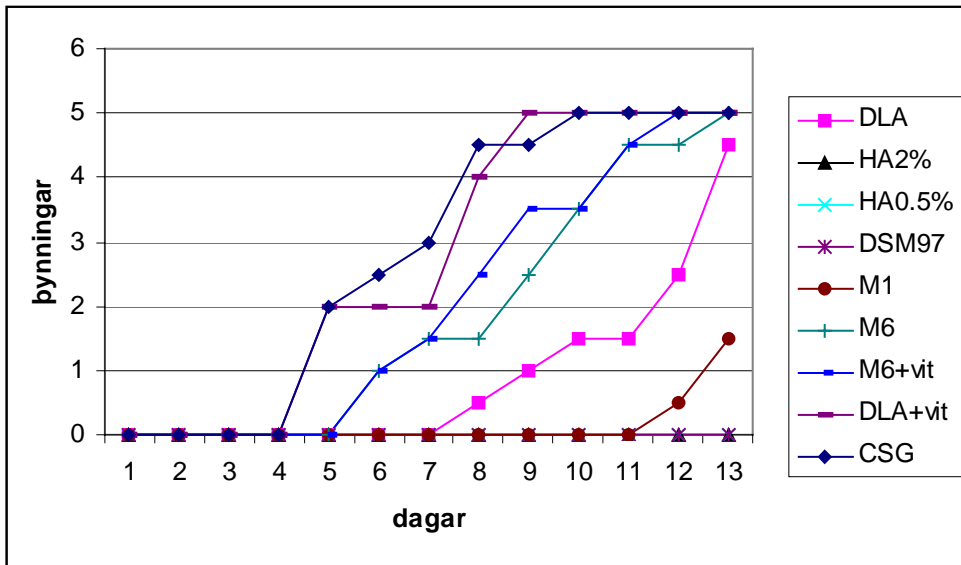
Log af heildarfj.									
Sýni	DLA	HA2%	HA0.5%	DSM97	M1	M6	M6+vit	DLA+vit	CSG
Halobacterium	6,60	0	0	0	5,91	6,53	6,96	0	8,29
Halococcus	5,89	0	0	0	4,08	6,68	6,32	7,98	7,30
Rf-stofn	0	0	0	0	0	7,78	7,52	7,81	7,76
Saltsýni 1	5,36	0	0	4,34	4,14	5,20	5,13	4,27	0
Saltsýni 2	5,74	0	0	4,17	0	3,90	4,27	3,20	0

Tafla 1. Talningar af þeim skálum sem hafði vaxið á og hægt var að telja, eftir 14 daga ræktun.

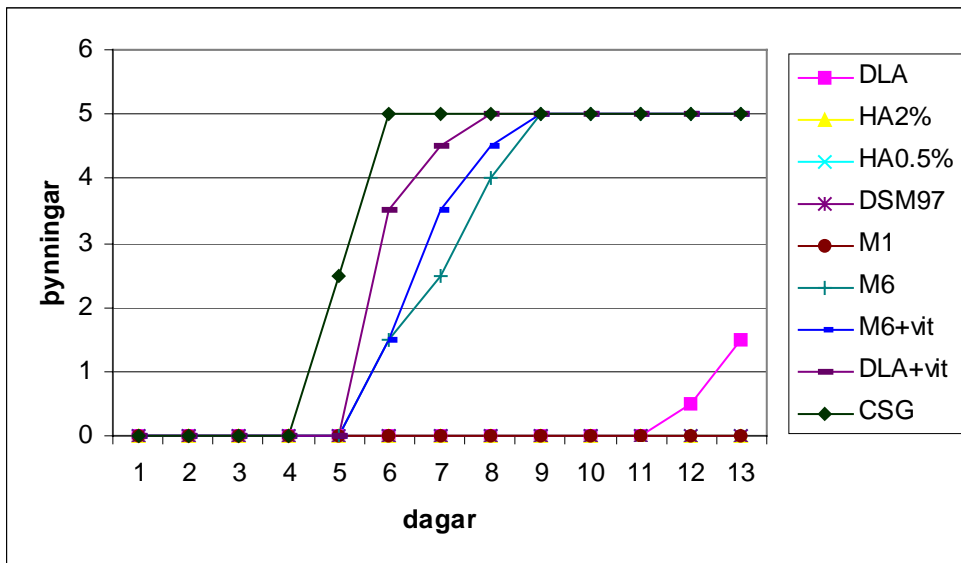
Á töflu 1 sést að talningar á *Halobacterium* voru svipaðar á DLA og M6 og M6 með vítamínum, M1 gaf einum log lægra en CSG gaf mestan vöxt. Fyrir *Halococcus* gáfu M6 og M6 með vítamínum aðeins hærri talningar en DLA en DLA með vítamínum og CSG gaf mestan vöxt. Rf stofnin náði sér hins vegar ekki upp á DLA, en þar sem að þessi stofn er ávallt notaður á þessu æti er líklegt að eitthvað hafi gerst í sáningunni. GSC, M6 og M6 með vítamínum koma hins vegar mjög vel út fyrir þennan stofn. Bæði menguðu saltsýnin koma best út á DLA en á hinum ætunum er minni vöxtur sem kemur líka seinna fram. Einnig kemur eingöngu fram vöxtur á DSM97 í saltsýnunum en ekki á viðmiðunarstofnum þrátt fyrir að þetta er það æti sem mælt var með til ræktunar þeirra. CSG kemur mjög vel út fyrir viðmiðunarstofnana en hins vegar vex ekkert úr saltsýnunum á því æti.



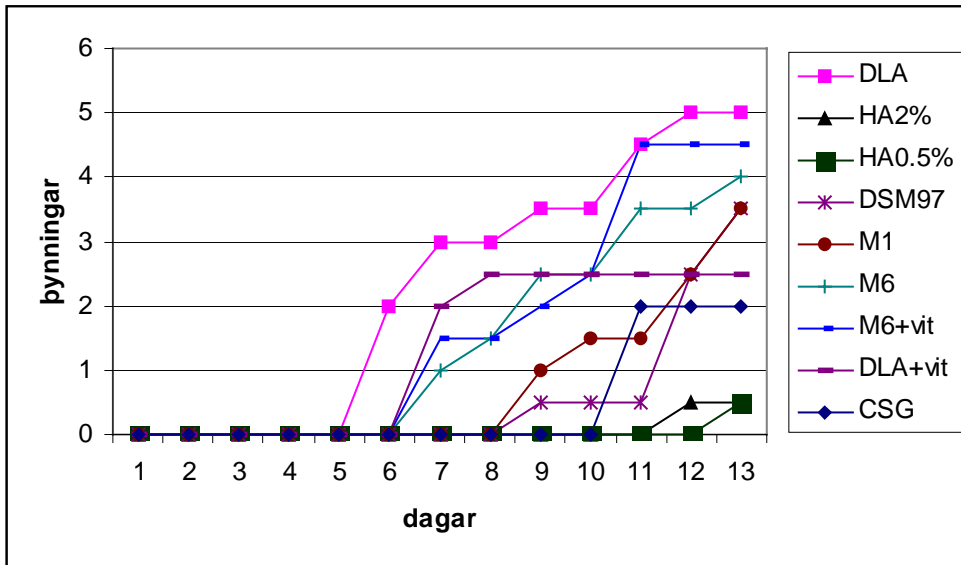
Mynd 1. Vöxtur *Halobacterium* á mismunandi ætum



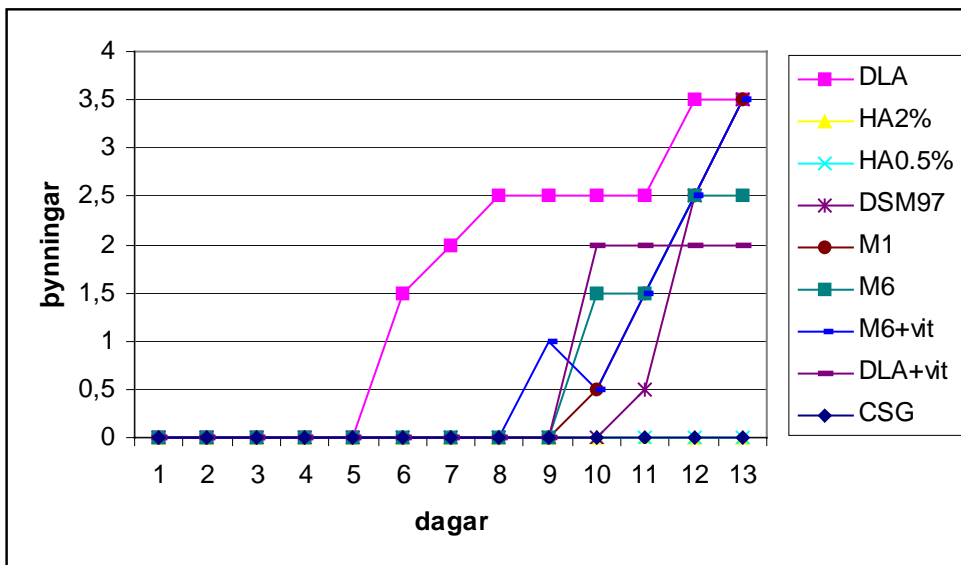
Mynd 2. Vöxtur *Halococcus* á mismunandi ætum



Mynd 3. Vöxtur Rf- kontrolstofns á mismunandi ætum



Mynd 4. Vöxtur saltsýnis 1 á mismunandi ætum



Mynd 5. Vöxtur saltsýnis 2 á mismunandi ætum

Myndir 1-5 sýna að á mörgum þessum ætum er kominn góður vöxtur eftir fjóra til fimm daga, en það á aðeins við um viðmiðunarstofnana. GSC, M6 og M6 með vítamínnum eru þau æti sem gefa mestan vöxt hjá þeim. Fyrir saltsýnin virðist DLA, það æti sem notað er við hefðbundna ræktun, vera það æti sem kemur best út. DLA með vítamínnum virðist gefa hraðari vöxt hjá viðmiðunarstofnunum en gerir það ekki í saltsýnunum sem kemur á óvart þar sem að vítamínin ættu að örva vöxtinn.

Þessar niðurstöður benda til þess að hægt sé að finna æti sem gefa hraðari vöxt ef um er að ræða viðmiðunarstofna en þeir eru hreinrækt af frumum og því er umhverfi saltsýnanna annað. Það má ef til vill leiða líkum að því að ástæðan fyrir því að þessi æti virðast ekki henta fyrir saltsýni sé að það séu færri frumur sem eigi erfðara uppdráttar í þessum ætum en í DLA og að í því æti sé einhver þáttur sem auðveldi vöxt bakteríanna.

Í ljósi þessara niðurstaðna að ekkert ætanna virtist örva vöxt fruma úr saltsýnunum var ákveðið að ekki sé æskileg leið að leita að nýjum ætum til ræktunar. Næsta skref var því að skoða hvort hægt sé að nota PCR tæknina til þess að greina þessar bakteríur í saltsýnum. En það er farið að nota þessa aðferð mikið til þess að athuga hvort ákveðnar bakteríur séu í sýnum eða ekki.

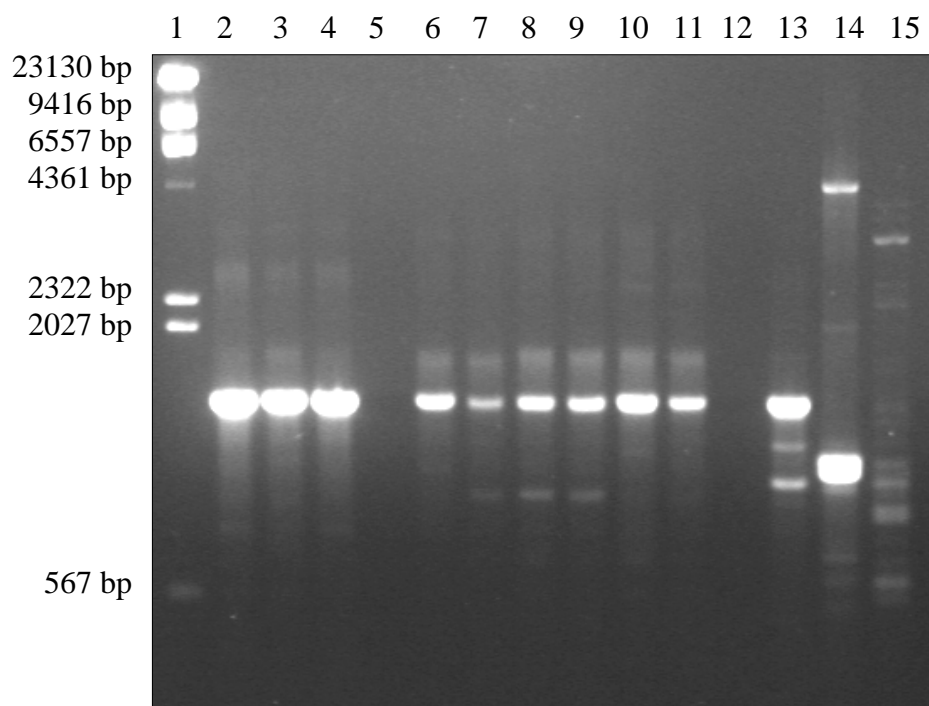
3.2. PCR mögnun á saltkærum bakteríum.

DNA úr sýnum var magnað með öllum primerasettum en eingöngu sett C gaf bönd þannig að hætt var að nota hin og eingöngu það sett notað (niðurstöður ekki sýndar). Böndin virtust líka koma betur fram ef lengri tími var notaður við mögnunina (35 hringir við 94°C í 1 mín, 55°C í 1 mín 72°C í 2 mín; niðurstöður ekki sýndar). Keyrð voru 24 saltsýni sem ræktað hafði verið úr og talið hafði verið úr með hefðbundinni aðferð. Einnig voru keyrðir með viðmiðunarstofnarnir, *Halobacterium salinarium*, *Halococcus morrhuae* og Rf-kontrolstofn.

PCR aðferðin sýndi eitt band (1900 bp) þar sem saltkærar bakteríur voru í sýnum (samkvæmt talningu á DLA agar) og aldrei kom fram band í neikvæðu kontróli sem fylgdi hverri keyrslu. Mengun virðist því ekki vera vandamál þar sem prímerarnir eru það sérhæfðir. Hins vegar var styrkleiki bandanna mjög misjafn eftir magni fruma. Þannig gat komið fram sterkt band þar sem var lágur fjöldi í talningu og svo hins vegar veikt band þar sem fjöldi var allt að log 7. Því virðist ekki vera hægt að nota þessa aðferð eins og hún er gerð hér til þess að magngreina fjölda baktería. Þannig að

ekki var hægt að nota GelCompar hugbúnaðarforritið til þess að reikna út þykkt bandanna og þannig áætla magn fruma eins og var hugmyndin í upphafi verkefnisins og lagt var til að gera.

Eins er þessi aðferð mjög næm og kom fram dauft band í sýni þar sem eingöngu hafði verið talið <10 frumur/ml (sjá mynd 6, rás 6). Það er einnig mjög líklegt að þessi aðferð magni einnig upp DNA dauðra fruma og þannig verði böndin sterkari en ef aðeins væri um að ræða lifandi frumur. Eins er mjög líklegt að þessi aðferð greini óræktanlegar (non-cultivable) frumur, það er þær frumur sem ekki ræktast við hefðbundnar ræktunaraðferðir (Martínes-Murcia *et al.* 1995).



Mynd 6: PCR rafráttur: Rásir: 1. Þyngdarmarker, 2. *Halobacterium salinarium*, 3. *Halococcus morrhuae*, 4. Rf kontrolstofn, 5. neikvætt kontrol, 6. saltsýni < 10 frumur/g, 7. saltsýni 1.92×10^6 , 8. saltsýni 1.3×10^5 , 9. saltsýni 8.8×10^4 , 10. saltsýni 2.3×10^4 , 11. saltsýni 1.3×10^6 , 12. Merck salt, 13. *Pseudomonas* II, 14. *Pseudomonas* I, 15. *Hafnia alvei*.

Til þess að skoða sérhæfni þessara þrímera var DNA einangrað úr nokkrum Gram neikvæðum stofnum sem til eru á Rf, þessir stofnar eru: *Serratia*, *Hafnia alvei*,

Yersinia enterocolitica, *E. coli*, *Enterobacter aerogenosa*, *Pseudomonas* I, *Pseudomonas* II, *Pseudomonas* III-IV og *Shewanella putrefaciens* (sjá mynd 6, en ekki allir stofnar sýndir). Það kom ekki fram 1900 bp band í neinum þessara stofna nema *Pseudomonas* II (mynd 6, rás 13) en auk þess komu önnur bönd fram.

Þessa aðferð er hægt að nota sem vísbendingu um hvort roðagerlar séu í salti en hún getur ekki gefið vísbendingu um magnið.

Af þessu verkefni má álykta að ekki sé unnt að finna æti sem örva vöxt roðagerla og til þess að geta magngreint sýni með PCR er nauðsynlegt að fara aðra leið, að nota magnbundna PCR aðferð, en sú aðferð hefur enn ekki verið sett upp á Rf en stefnt er að því að gera það. Hins vegar er óvíst að sú leið leysi vandamálið með dauðar frumur og óræktanlegar í sýnum.

4. HEIMILDIR.

Arahal, D.R., Dewhirst, F.E., Paster, B.J., Volcani, B.E. og Ventosa, A. (1996). Phylogenetic Analyses of Some Extremely Halophilic Archaea Isolated from the Dead Sea Water, Determined on the Basis of their 16S rRNA Sequences. *Applied and Environmental Microbiology*. vol 62, no 10, pp 3779-3789.

Benloch, S., Acinas, S.G., Martínez-Murcia, A.J. og Rodríguez-Valera (1996). Description of prokaryotic biodiversity along the salinity gradient of a multipond solar saltern by direct PCR amplification of 16S rDNA. *Hydrobiologia*, vol. 329, pp. 19-31.

Chandler, R.E and McMeekin, T.A. (1989). Combined effect of temperature and salt concentration/water activity on the growth rate of *Halobacterium* spp. *Journal of Applied Bacteriology*, 67, pp.71-76.

DSM Catalogue of Stains 1989. Fjórða útgáfa.

Dundas, I.D., Srinivasan, V.R. og Halvorsson, H.O. (1963). A chemically defined medium for *Halobacterium Salinarium* strain 1. *Canadian Journal of Microbiology*, 9 pp. 619-625.

Dussault, H.P. og Lachance, R.A. (1952). Improved Medium for Red Halophilic Bacteria from Salt Fish. *J. Fish. Res. Bd. Can.* Vol 9, no. 3, pp. 157-163.

Gochnauer, M.B. og Kushner, D.J. (1969). Growth and nutrition of extremely halophilic bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol 15, pp.1157-1165.

Gæðastaðall SÍF fyrir sjávarsalt til saltfiskframleiðenda.

Larsen, H. (1981) The Family of Halobacteriaceae. In: The Prokaryotes. Springer Verlag.

Martínez-Murcia, A.J., Acinas, S.G. og Rodriguez-Valera, F. (1995). Evaluation of prokaryotic diversity by restriction digestion of 16S rDNA directly amplified from hypersaline environments. *FEMS Microbiology Ecology*. Vol 17, pp. 247-256.

Onishi, H. McChance, M.E. og Gibbons, N.E. (1965). A Synthetic Medium for Extremely Halophilic Bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, vol. 11, pp. 365-373.

Simmonds, C.K. og Lamprecht, E. (1984). Growth of halophiles on salted snook. Fishing Industry Research Institute, Cape Town, No. 38. pp 38-39.

Vandersant, C. og Splittstoesser, D. (Eds.)(1992). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 3rd ed. American Public Health Association.

Vilhelmsson, O. (1997). Einangrun og greining baktería af saltfiski. Ritgerð til meistaraþrófsgráðu í matvælafræði. Háskóli Íslands.

Walsh, P.S., Metzger, D. og Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a Medium for simple Extraction of DNA for PCR-Base Typing from Forensic Material. *BioTechniques*, vol. 10, no. 4, pp. 506-513.