

Nr. 21

8. maí 1973

GERLARANNSÓKNIR

GERLAGRÓÐUR Í SÖLTUÐUM GRÁSLEPPUHROGNUMÁhrif rotvarnarefna

Sigurður Pétursson

Árið 1971 var í gerladeild Rannsóknastofnunarinnar gerð gerlatalning í 281 sýni af söltuðum grásleppuhrognum af framleiðslu þess árs. Með tilliti til þess, að í söltuðum grásleppuhrognum eru venjulega 10-12% af salti, var gerlaræktuninni hagað á eftirfarandi hátt: 11 g af hrognum voru vigtuð út í 99 cm<sup>2</sup> af sterilu 10%-saltvatni og hrist á venjulegan hátt. Samskonar saltvatn var notað í áframhaldandi þynningar. Sáð var í Difco "plate-count"-agar að viðbættum 5% af salti og ræktað við 22°C í 72 klst. Niðurstöðum gerlatalninganna, svo og mælinga á salti hrognanna og sýrustigi, hefur verið lýst í Tæknitíðindum nr. 9 (25/10 1972).

Af ofanefndu 281 sýni var hreinræktað frá 126. Voru valdar úr á agarskálunum þær tegundir, sem ríkjandi voru í þeirri þynningu, er talið var í (30-300 per skál). Sýnin 126 voru frá 72 framleiðendum, og var alls sáð 205 stofnum. Sáð var á skáagar (Difco "plate-count"-agar + 5% salt) og ræktað við 22°C. Flestir stofnanna reyndust vera kúlugerlar, breytilegir að gerð, gulir eða litlausir, ennfremur var mikið af kvikum stafgerlum án dvalagróa og af torúlum. Eftir lit gróðursins og vaxtarlagi frumanna svo og áberandi miklu saltþoli nokkurra stofna, var 187 stofnum skipað í 5 flokka, eins og sýnt er í töflu I. Í töflunni er einnig sýnd dreifing gerlastofnanna á sýnin 126 og á framleiðendurna 72. Hinir stofnarnir 18, flest stafgerlar án gróa, uxu mjög illa eða dóu út undir þeim vaxtarskilyrðum, er hér voru gefin.

Tafla I.

Dreifing 187 gerlastofna eftir sýnum og framleiðendum.

Flokkur	Fjöldi stofna	Fjöldi sýna	Fjöldi framleiðenda
1. Gulir, kúluform	46	41	29
2. Litlausir, kúluform, A	75	56	42
3. Litlausir, kúluform, B	15	14	14
4. Stafgerlar án gróa	13	9	7
5. Torúlur	38	36	29

Athugað var sérstaklega, hvort nokkuð samræmi væri milli ríkjandi gerlaflokka í hverju sýni annars vegar og hins vegar gerlafjöldans í sýninu, saltmagns þess, sýrustigs eða uppruna. Slíkt samræmi var nær hvergi finnanlegt. Það einasta athyglisverða var eftirfarandi: Í þeim 14 sýnum, sem höfðu gerlafjölda yfir 1 milljón per 1 g var torúla ríkjandi í 7, litlausir kúlulaga gerlar af 2. flokki í 6 og stafgerlar án gróa í einu. Aðeins 4 af þessum sýnum höfðu verið metin gölluð við skynmat og voru kúlugerlarnir ríkjandi í 3 þeirra, en torúla í einu. En þetta voru líka þau sýni, sem hæst voru í gerlafjölda.

Með tilliti til þess, að bæði grásleppuhrognin og kavíarinn, sem úr þeim er unninn, eru rotvarin með salti og Na-benzóati, var prófað þol flestra gerlastofnanna gegn þessum efnum og ennfremur gegn sítrónusýru og Konservál KD. Var stofnunum sáð á skáagar (Difco "plate-count"-agar), sem í var blandað viðkomandi efnum, og ræktað við 22°C í 6 daga. Niðurstöðurnar eru sýndar í töflum II - V. Er magn vaxtarins táknað þannig:

+++ = góður vöxtur  
++ = sæmilegur vöxtur  
+ = lítill vöxtur  
- = enginn vöxtur

Í töflurnar er svo skráður fjöldi þeirra gerlastofna, sem ná viðkomandi vaxtarmagni.

Tafla II.

Saltþol

P. c. agar, pH 7.0, 22°C í 6 daga

Flokkur	Vöxtur	S A L T %					
		0,85%	5%	9%	13%	16.5%	20%
1. Gulir, kúluform 35 stofnar	+++	33	34	12	0	0	
	++	2	1	21	2	0	
	+			2	17	2	
	-				11	33	
2. Litlausir, kúluform, A 59 stofnar	+++	56	56	16	0	0	
	++	3	3	35	0	0	
	+			3	2	0	
	-			5	57	59	
3. Litlausir, kúluform, B 15 stofnar	+++	15	15	15	15	2	0
	++					11	3
	+					2	9
	-						3
4. Stafgerlar, án gróa 9 stofnar	+++	9	3	0	0		
	++		6	1	0		
	+			6	0		
	-			2	9		
5. Torúlur 38 stofnar	+++	38	38	34	0	0	0
	++			4	10	0	0
	+				28	14	0
	-					24	38

Tafla III.

Áhrif Benzóesýru

Pl. c. agar, pH 5.5, salt 5%, 22°C í 6 daga

Flokkur	Vöxtur	Na-benzóat %			
		0.0	0.1%	0.2%	0.3%
1. Gulir, kúluform 35 stofnar	+++	35	0	0	0
	++		9	0	0
	+		4	1	0
	-		22	34	35
2. Litlausir, kúluform, A 59 stofnar	+++	30	3	0	0
	++	28	7	1	0
	+	1	8	1	0
	-		41	57	59
3. Litlausir, kúluform, B 15 stofnár	+++	2	0	0	0
	++	10	2	0	0
	+	3	12	8	1
	-		1	7	14
4. Stafrerlar, án gróa 9 stofnar	+++	3	0		
	++	6	0		
	+		0		
	-		9		
5. Torúlur 38 stofnar	+++	38	35	22	0
	++		3	11	8
	+			5	27
	-				3

Tafla IV.

Áhrif sítrónsýru

P.c. agar, salt 0.85%, 22°C í 6 daga

Flokkur	Vöxtur	Sýrustig, pH			
		7.0	6.7	6.0	5.5
1. Gulir, kúluform 23 stofnar	+++	23	23	22	20
	++			1	3
	+				
	-				
2. Litlausir, kúluform, A 5 stofnar	+++	5	5	5	5
	++				
	+				
	-				
3. Litlausir, kúluform, B 1 stofn	+++	1	1	1	1
	++				
	+				
	1				
4. Stafgerlar, án gróa 9 stofnar	+++	9	6	4	1
	++		3	5	4
	+				4
	-				
5. Torúla 20 stofnar	+++	20	20	20	20
	++				
	+				
	-				

Tafla V.

Áhrif Konservál K.D.

Pl.c. agar, 5% salt, pH 5.5, 22°C í 6 daga

Flokkur	Vöxtur	K. D. %			
		0.0	0.1%	0.2%	0.3%
1. Gulir, kúluform 25 stofnar	+++	25	10	0	
	++		2		
	+		7		
	-		6	25	
2. Litlausir, kúluform, A 38 stofnar	+++	36	0	0	
	++	2	0	0	
	+		1	0	
	-		37	38	
3. Litlausir, kúluform, B 3 stofnar	+++	2	0		
	++	1	0		
	+		0		
	-		3		
4. Stafrerlar, án gróa 9 stofnar	+++	3	0	0	
	++	6	0	0	
	+		2	0	
	-		7	9	
5. Torúlur 20 stofnar	+++	20	0	0	0
	++		12	0	0
	+		8	11	6
	-			9	14

Eins og fram kemur í töflu II, þá eru gerlastofnarnir yfirleitt allir saltþolnir, en enginn þeirra vex betur við hækandi saltmagn. Viðkvæmastir gegn saltinu eru stafgerlarnir, en þolnastir eru stofnarnir í 3. flokki og torúlurnar. Hafa stofnarnir 15 í 3. flokki algera sérstöðu í þessu efni. Þó kom í ljós, að sýnin, sem þeir voru ræktaðir úr, voru ekki saltari en gerðist.

Áhrif benzóesýru eru sýnd í töflu III. Na-benzóat verkar aðeins í súrri upplausn og var valið pH 5.5, þar sem það er nálægt þeim sýrustigum, sem algengust eru, bæði í hrognunum söltuðum og í kavíarnum. Í ljós kemur í töflunni, að stafgerlarnir þola benzóesýru mjög illa, gerlarnir í 1. - 3. flokki heldur betur, einkum gerlarnir í 3. flokki. Torúlurnar aftur á móti þola benzóesýruna vel.

Til þess að kanna, hvort sýrustigið út af fyrir sig hefði haft áhrif á niðurstöðurnar í töflu III, var gerð tilraun með sítrónsýru í stað benzóesýru. Eru niðurstöður þeirrar tilraunar spndar í töflu IV. Eins og þar kemur í ljós, hefur sýrustig allt niður í pH 5.5 svo að segja engin áhrif nema á stafgerlana.

Í Þýzkalandi er algengt að nota til rotvarna á kavíar blöndu rotvarnarefna, sem nefnist Konservál K.D. Er þetta blanda af sorbínsýru, benzóesýru, maurasýru og PHB-ester. Leyfilegt hámark þessarar blöndu í kavíar er 0.3%. Blanda þessi var prófuð á flesta gerlastofnana, og eru niðurstöðurnar sýndar í töflu V. Kemur þar í ljós, að KD hefur meiri drepanði áhrif en benzóesýra á litlausu gerlana í 2. og 3. flokki, og einnig á torúlurnar.

Þar sem ástæða þótti til að átla, að sorbínsýra hefði sérstaklega drepanði áhrif á torúlurnar (sbr. Tæknitíðindi nr. 9) var gerð sérstök tilraun þar að lútandi. Reyndust torúlurnar þola vel 0.3% af sorbínsýru við pH 5.5 og 5% af salti, 0.4% sorbínsýru þoldu þær illa eða alls ekki, en enginn stofn þoldi 0.5%. Var þolið meira en við var búizt.

Eins og að framan var getið, þá var vaxtarlag gerlanna í 1., 2. og 3. flokki talsvert breytilegt í einum og sama stofni, auk þess sem litblær og áferð gróðursins gátu verið talsvert afbrigðileg milli stofnanna innbyrðis. Þannig voru gulu stofnarnir í 1. flokki ekki allir með sama gula litnum, enda þótt gerð frumanna væri hliðstæð. Í hverjum stofni var blanda af einstökum kúlugerlum, diplokokkum, stuttum keðjum af sér kennilegri gerð, tetrakokkum og klösum. Stærðin var yfirleitt 0.7-1  $\mu$

en einstaka diplokokkar voru allt að tvöfalt stærri. Í 2. og 3. flokki voru litlausir eða gráir gerlastofnar, en litblær og áferð voru ofurlítið mismunandi. Yfirleitt var mest um einstaka kúlugerla og diplokokka, en diplokokkarnir voru oft óvenjulega langvaxnir næstum staflaga, og fyrir komu í 2. flokki keðjur, sem meira líktust streptobacteria, en streptococcus. Stærðin var yfirleitt 0.8-1  $\mu$  í þvermál, en einstaka frumur í sumum stofnanna í 2. flokki gátu orðið 2  $\mu$  á lengd. Stofnarnir í 3. flokki voru miklu reglulegri, einstakir kokkar og diplokokkar undantekningarlítið.

Þessi mikla fjölbreytni í gerð frumanna í sama stofni þótti að sjálfsögðu grunsamleg, og var því mörgum stofnanna í 1. og 2. flokki sáð oftast en einu sinni á agarskálar og hreinræktað á nýjan leik, til þess að prófa, hvort þeir væru hreinir. En allt kom fyrir ekki, fjölbreytnin í vaxtarlaginu hélt áfram.

Þar sem stofnar úr 1.-3. flokki voru meira og minna ríkjandi í öllum hrognasýnunum, sem ræktað var úr, og líta varð því á þá sem einkennandi fyrir gerlagróður saltaðra grásleppuhroga, þótti æskilegt að fá úr því skorið, hvaða gerlategundir hér væri um að ræða. Var því leitað til rannsóknastöðvarinnar í Torry í Aberdeen og farið þangað með nokkra gerlastofna, sem sérkennilegir voru fyrir 1.-3. flokk. Skoðun sérfræðinga þar við fyrstu sýn þessara stofna var sú, að hér væri sennilega um að ræða Coryneformtegundir. Er nú beðið nánari upplýsinga frá Torry, en hér er í töflu VI sýndar niðurstöður nokkurra rannsókna, sem hingað til hafa verið gerðar hér á þessum stofnum, auk þeirra, er að framan hefur verið getið.

Tafla VI.

Nokkur einkenni 103 gerlastofna í 1.-3. flokki

Flokkur	Fjöldi stofna	Gram litun	Upplausn á gelatini	Afildun á nitrat
1. Gulir, kúluform	8	+	+	+
	10	+ -	+	+
	17	+ -	+	-
2. Litlausir, kúluform, A	13	+	-	+
	7	+	-	-
	23	+ -	-	+
	13	+ -	-	-
3. Litlausir, kúluform, B	10	+	-	+
	2	+ -	-	+



Eins og fram kemur í töflu VI, þá eru flestir stofnarnir í 1. og 2. flokki reikulir gagnvart Gram-litun. Stofnarnir í 1. flokki eru allir gelatíni-leysandi en stofnarnir í 2. og 3. flokki leysa ekki gelatíni. Eins og áður er fram tekið, þá hafa stofnarnir í 3. flokki þá sérstöðu að þeir eru mjög saltþolnir.

Stafgerlarnir í 4. flokki voru allir kvikir og án gróa. Skiptust þeir í 2 hópa:

a) 6 stofnar, lengd 2-10 (20)  $\mu$ , Gram-pósítífir, leysa ekki gelatíni

b) 3 stofnar, lengd 0.5-1  $\mu$ , Gram-negatífir, leysa gelatíni, þola betur 5% salt en hópur a.

Torúlurnar í 5. flokki voru allar af sömu gerð, regluleg kúlulögun, stærð 3-6  $\mu$ . Greina mátti tvennskonar gerð af agarkólóníum, en sá munur var mjög lítill.

Af framanefndum 187 stofnum eru geymdir 19 stofnar til frekari rannsókna. eru þeir þannig valdir, að þar er að finna öll helztu afbrigðin, sem komið hafa í ljós við framanskráða rannsókn.

Árið 1972 var í gerladeild Rannsóknastofnunarinnar gerð gerlatalning og saltmæling á 376 aðsendum sýnum af söltuðum grásleppuhrognum. Af þeim voru 222 frá Fiskmati ríkisins. Úr þeim sýnum voru valin 95 sýni, flest með 10-12% salti, en nokkur með 12-15%, og var leitast við að ákveða magn ríkjandi gerlategunda í hverju þeirra. Voru enn valdar skálar af þeirri þynningu, sem talið var í (30-300 kólóníur per skál). Eftir útliti og smásjárrannsókn voru greindar þær gerðir af kólóníum, sem ríkjandi voru á skáluunum, og fjöldi kólónía af hverri gerð svo talinn eða áætlaður. Kólóníunum var skipað í 4 flokka samsvarandi 1., 2., 4. og 5. flokki hér að framan. eru niðurstöðurnar sýndar í töflu VII.

Tafla VII.

Ríkjandi gerlaflokkar í 95 sýnum af söltuðum grásleppuhrognum (1972).

Fjöldi gallaðra sýna í svigum.

Gerlafjöldi per 1 g	F ö l d i s ý n a			
	Gulir, kúluform	Litlausir, kúluform	Stafgerlar, án gróa	Torúlur
100- 1.000	3	2		3
1.000- 10.000	8	9	1	5
10.000- 100.000	12	28	7	16
100.000- 1.000.000	6(2)	7(2)	9	17(1)
1.000.000- 10.000.000	1	6(3)	7(1)	10(5)
10.000.000- 100.000.000		1	6(1)	1
Alls:	30(2)	53(5)	30(2)	52(6)

Eins og taflan ber með sér, þá eru oftast fleiri en einn flokkur gerla ríkjandi í hverju sýni. Oftast eru það litlausu kúlulaga gerlarnir af 2. flokki og torúlurnar, sem eru ríkjandi. Af sýnunum 95 voru 9 metin gölluð við skynmat. Er tala þessara gölluðu sýna skráð í svigum aftan við heildartöluna í hverjum flokki í töflu VII. Eru þessi gölluðu sýni dreifð á alla flokkana og einsog við er að búast þá eru þau meðal þeirra sýna, sem hafa mestan gerlafjölda. Í 10 af 15 tilfellum er gerlafjöldinn yfir 1 milljón per 1 g. Eftirtektarvert er, hversu 4. flokkur (stafgerlar án gróa) kemur vel út í skynmati, enda þótt gerlafjöldinn sé þar oft mjög mikill.

Í ljós kom sú regla, að því meiri gerlafjöldi, sem er í sýninu, því færri gerlategundir eru þar ríkjandi, oftast aðeins ein eða tvær í þeim gerlaríkustu. Í sýnum með lítinn gerlafjölda koma aftur á móti fram margar tegundir.

Á árinu 1972 bárust 10 sýni með litlu saltmagni (6.3-9.5%), sem öll voru gölluð við skynmat. Var 2. flokkur (litlausir, kúlulaga gerlar) ríkjandi í þeim öllum (3-300 milljónir per 1 g), en auk þess 1. flokkur (gulir kúlurgerlar) í einu (15 milljónir per 1 g) og 4. flokkur (stafgerlar án gróa) í tveimur (24 og 600 milljónir per 1 g).

#### Niðurstöður

Ríkjandi gerlategundum, hreinræktuðum úr 126 sýnum af söltuðum grásleppuhrognum árið 1971, var skipað í 5 flokka: 3 flokkar af kúlulaga gerlum nokkuð breytilegum að gerð, margir gulir en fleiri litlausir eða gráir, þar af nokkrir mjög saltkærir, 1 flokkur af kvikum stafgerlum án gróa og 1 flokkur af torúlum.

Prófuð voru áhrif eftirtalinna rotvarnarefna á gerlastofnana: salt, benzoesýra, sítrónsýra og Konservál K.D., og auk þess sorbínsýra á torúlurnar. Nokkrir litlausir kúlurgerlar þoldu allt að 20% salt og torúlurnar 13-16%, en aðrir stofnar heldur minna, einkum stafgerlarnir. Gerlastofnarnir í 2. og 3. flokki þoldu Konservál K.D. verr en benzoesýru og sömuleiðis torúlurnar. Sýrustig pH 5.5 þoldu stofnarnir yfirleitt vel. Sorbinsýra reyndist ekki hindra vöxt torúlanna fyrr en við 0.4-0.5%.

Í 95 sýnum af söltuðum grásleppuhrognum frá 1972 reyndust litlausir, kúlulaga gerlar og torúlur oftast ríkjandi, einnig í þeim sýnum, sem metin voru gölluð við skynmat.