

Verkefnaskýrsla Rf  
30 - 03



# Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins

Desember 2003

**NOTKUN MALTHUS  
LEIÐNITÆKNI TIL  
HRAÐVIRKRA ÖRVERUMÆLINGA**

Hélène L. Lauzon



Titill / Title	<i>Notkun Malthus leiðnitækni til hraðvirkra örverumælinga</i>		
Höfundar / Authors	<i>Hélène L. Lauzon</i>		
Skýrsla Rf / IFL report	30-03	Útgáfudagur / Date:	Desember/Dec. 2003
Verknr. / project no.	1434		
Styrktaraðilar / funding:	<i>Rannís og Rf</i>		
Ágríp á íslensku:	<p>Í verkefni sem styrkt var af RANNÍS (nr. 990120099) hefur verið unnið að uppsetningu og prófun hraðvirkra mælingaaðferða fyrir sérhæfðar skemmdarörverur (SSÖ) í ferskum fiski. Malthus leiðnitækni var prófuð til að meta heildarörverufjölda í ferskum ýsuflökum, auk fjölda <i>Pseudomonas</i> tegunda og <i>Photobacterium phosphoreum</i>, eins og kynnt er í þessari skýrslu. Malthus-PPDM aðferðin er sú eina þekkt sem á sérhæfðan hátt segir til um fjölda <i>P. phosphoreum</i> í fiski. Það er því nauðsynlegt að geta notað slíka tækni hér á landi til þess að meta mikilvægi þessarar bakteríu í íslenskum fiski.</p> <p>Meginmarkmið Rannís verkefnisins var að afla þekkingar um vöxt sérhæfðra skemmdarörvera (SSÖ) og myndun niðurbrotsefna í fiski. Þróun hraðvirkra mæliaðferða er nauðsynleg því hún getur verið þýðingarmikil fyrir fiskframleiðendur sem þurfa að meta gæði hráefnisins. Þekking á skemmdarferli fersks fisks og samsetningu skemmdarflórunnar er grunnur fyrir frekari þróun hraðvirkra aðferða.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Hraðvirkar mælingar - Malthus leiðnitækni- heildarörverufjöldi – Pseudomonas tegundir – Photobacterium phosphoreum</i>		
Summary in English:	<p>The setup and testing of rapid microbiological methods based on conductance (Malthus) are presented in this report. Evaluation of total viable counts (TVC), as well as counts of presumptive <i>Pseudomonas</i> spp. and <i>Photobacterium phosphoreum</i> is carried out and compared to available conventional methods. Malthus-PPDM method is the only one known to specifically enumerate <i>P. phosphoreum</i> in fish. It is therefore necessary to setup such a method in order to be able to assess the importance of this bacterium in Icelandic fish products.</p> <p>This was part of a national project aiming at acquiring a better knowledge on growth of specific spoilage organisms (SSO) and production of microbial metabolites in fish. The development of rapid methods is indispensable for fish producers as a tool to assess fish quality efficiently. A better understanding of fish spoilage and the composition of the developing spoilage microflora is the basis for further development of rapid methods.</p>		
English keywords:	<i>Rapid methods – Malthus – conductance – TVC – Pseudomonas spp. - Photobacterium phosphoreum</i>		

## EFNISYFIRLIT

<b>1. INNGANGUR .....</b>	<b>2</b>
<b>2. FRAMKVÆMD .....</b>	<b>3</b>
2.1. Grunnathuganir á Malthus tækinu .....	3
2.2. Undirbúningur fisksýna til mats á Malthus mæliaðferðunum .....	3
2.3. Uppsetning Malthus mæliaðferðar til mats á heildarörverufjölda fiskafurða og gerð staðalkúrfu .....	4
2.4. Uppsetning mæliaðferðar til talningar á <i>Photobacterium phosphoreum</i> og gerð staðalkúrfu.....	6
2.5. Uppsetning mæliaðferðar til talningar á <i>Pseudomonas</i> tegundum og gerð staðalkúrfu.....	7
2.6. Endurtekningarrhæfni mæliaðferðanna (repeatability) .....	8
2.7. Hittni mæliaðferðanna (accuracy).....	8
<b>3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR .....</b>	<b>9</b>
3.1. Grunnathuganir á Malthus tækið .....	9
3.2. Undirbúningur fisksýna til mats á Malthus mæliaðferðunum .....	11
3.3. Uppsetning Malthus mæliaðferðar til mats á heildarörverufjölda fiskafurða og gerð staðalkúrfu .....	12
3.4. Uppsetning mæliaðferðar til talningar á <i>Photobacterium phosphoreum</i> og gerð staðalkúrfu.....	15
3.5. Uppsetning mæliaðferðar til talningar á <i>Pseudomonas</i> tegundum og gerð staðalkúrfu.....	20
3.6. Endurtekningarrhæfni mæliaðferðanna (repeatability) .....	23
3.7. Hittni mæliaðferðanna (accuracy).....	24
<b>4. ÁLYKTANIR .....</b>	<b>26</b>
<b>5. HEIMILDIR.....</b>	<b>27</b>
<b>VIÐAUKI A: Greiningarpróf notuð til ákvörðunar á bakteríu <i>Photobacterium phosphoreum</i> .....</b>	<b>29</b>

## 1. INNGANGUR

Hefðbundar aðferðir til örverumælinga og örverugreininga eru yfirleitt frekar tímafrekar. Þetta hefur leitt til þróunar á hraðvirkari aðferðum, þ.e.a.s. aðferðum sem eru einfaldar í framkvæmd, fljótvirkar, næmar og nákvæmar. Á áttunda áratugnum sýndu rannsóknir J.C.S. Richards o.fl. (1978) að leiðnibreytingar sem áttu sér stað í æti við ræktun örvera voru í samræmi við vöxt þeirra. Einnig kom í ljós að mælanlegur tími meðan leiðnibreytingar áttu sér stað voru í öfugu hlutfalli við log fjölda örvera. Eftir þessar uppgötvanir hafa fleiri rannsóknir verið gerðar, ýmis tæki og æti þróuð til að meta heildarörverufjölda eða fjölda ákveðinna örverutegunda, svo sem *Escherichia coli*, *Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, *Enterococcus*, *Pseudomonas* og histamín-myndandi örverur, en einnig til að finna *Salmonella* og *Listeria* tegundir (Gibson o.fl., 1984; Gibson & Ogden, 1987; Klausen & Huss, 1987; Jørgensen o.fl., 1988; Banks o.fl., 1989; Pettitt, 1989; Gatti & Neviani, 1993; Dupont o.fl., 1994; Pless o.fl., 1994; Capell o.fl., 1995). Nýlega hafa Danir þróað aðferð og æti til sérhæfðrar talningar á *Photobacterium phosphoreum* með notkun á svonefndu Malthus tæki (Dalgaard o.fl., 1996). Þetta tæki hefur verið til staðar á Rf um nokkurt skeið og þá eingöngu við prófanir á *Salmonella* og *Listeria*. Malthus tæknin er mun fljótari en stundum næmari en hefðbundnar aðferðir með ræktun á skálum.

Í verkefni sem styrkt var af RANNÍS (nr. 990120099) hefur verið unnið að uppsetningu og prófun hraðvirkra mælingaaðferða fyrir sérhæfðar skemmdarörverur (SSÖ) í ferskum fiski. Malthus leiðnitækni var prófuð til að meta heildarörverufjölda í ferskum ýsuflokum, auk fjölda *Pseudomonas* tegunda og *Photobacterium phosphoreum*. Með Malthus-tækninni fást niðurstöður innan þriggja sólarhringa um magn *Photobacterium* í fiski. Malthus-PPDM aðferðin er sú eina þekktá sem á sérhæfðan hátt segir til um fjölda *P. phosphoreum* í fiski (Dalgaard o.fl., 1996). Það er því nauðsynlegt að geta notað slíka tækni hér á landi og fá þannig betri yfirsýn yfir mikilvægi þessa gerils í íslenskum fiski.

## 2. FRAMKVÆMD

### 2.1. Grunnathuganir á Malthus tækinu

#### a) Svörun Malthus tækisins:

Malthus tækið var sett upp samkvæmt leiðbeiningum frá framleiðandanum (Malthus Instrument Ltd., UK). Eftir margra ára geymslu var athugað hvort tækið virkaði rétt og hversu áreiðanleg (endurtekningarrhæfni, repeatability) mæligildin voru sem fengust með einfaldri mælingu. Malthus SPYE æti (#490-001) var búið til og gerileytt við 121°C í 15 mín. Tveir ml af ætinu voru skammtaðir í 56 Malthus sellur sem höfðu verið gerileyddar. Næturækt (40 klst við 15°C) af *Pseudomonas fluorescens* NCTC 3756 var þynnt 1000-falt (0,1 ml í 100 ml MRD, Oxoid) og 1 ml skammtaður í sellurnar. Sérstakir tengitappar, sem tengja elektróðu hvernar sellu og hólfaðan bakka saman í Malthus baðinu, voru settir á sellurnar og þær láttnar í Malthus baðið sem stillt var við 15°C. Upplýsingar um sýnin voru skráðar í tölvu sem er tengd Malthus tækinu. Þegar svörun (mælanleg breyting í leiðni ætisins) fékkst var tímalengdin (detection time, DT) fyrir hvert sýni skráð niður. Þessi tími er háður fjölda þeirra örvera sem verið er að leita. Við háan örverufjölda verður tíminn stuttur, en lengri þegar lægri fjöldi er til staðar í sýninu. Endurtekningarrhæfni mælingarinnar (repeatability) var reiknuð út sem % staðalfrávik.

#### b) Viðnámsmælingar:

Kannað var hvort viðnámsmælingar fyrir hverja sellu sem er tengd hólfuðum bakka Malthus tækisins voru stöðugar. Sett var sterílt SPYE æti (3 ml) í sellurnar og þær settar í Malthus baðið. Mælingarnar voru skráðar niður í upphafi, eftir 30 mín, 19 klst og 21 klst. Einnig var athugað hvort leiðnimælingarnar voru stöðugar í hverri sellu með því að skoða línuritin sem sjást í tölvunni og samanburður gerður milli sella.

### 2.2. Undirbúningur fisksýna til mats á Malthus mæliaðferðunum

Tólf roðflett ýsuflök fengust hjá TROS hf. Örverufræðileg gæði hráefnisins voru metin í einu flaki. Fimm flakanna voru geymd áfram í frauðplast boxinu, sex voru gaspökkuð

(MAP: 60%CO<sub>2</sub>/ 40% N<sub>2</sub>) í þykka nælon poka og einnig geymd á ís við 0-2°C. Flökin voru metin samkvæmt hefðbundnum örverufræðilegum og Malthus aðferðum með reglulegu millibili yfir 14-daga (flökin geymd í lofti) og 20-daga (MAP-flökin) tímabil.

### **2.3. Uppsetning Malthus mæliaðferðar til mats á heildarörverufjölda fiskafurða og gerð staðalkúrfu**

Þessi mæliaðferð var prófuð samkvæmt upplýsingum sem gefnar voru af Malthus framleiðandanum. Tveir ml af SPYE ætinu voru skammtaðir í Malthus sellur (gerileyddar) og þær geymdar í kæli.

#### *a) Mælingar á nokkrum bakteríutegundum:*

Ræktir (26 klst við 15°C) af mismunandi bakteríustofnum (Tafla 1) voru þynntar 1000-falt (10 µl þynnt í 10 ml kælt MRD). Eftirfarandi blöndur voru búnar til: P1 (stofnar 54+127), P2 (38+131), P3 (35+76), P4 (277+286), Sp (92+126); annars voru hinir stofnarnir notaðir sér. Einn ml af hverjum stofni (eða blöndu) var skammtaður í 3 sellur, tapparnir settir á og sellurnar látnar í Malthus baðið (15°C). Upplýsingar um sýnin voru skráðar í tölvu. Þegar svörun fékkst var tímalengdin (DT) fyrir hvert sýni skráð niður. Þetta var gert til að athuga hvort helstu bakteríutegundir sem einangrast úr skemmdum fiski ásamt öðrum tegundum náðu að fjölga sér í þessum æti og hvaða DT fékkst fyrir hverja bakteríutegund.

**Tafla 1.** Heiti og uppruni bakteríustofnanna

Bakteríustofn	Stofnnúmer	Uppruni stofna
<i>Pseudomonas I</i>	54	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 10°C
<i>Pseudomonas I</i>	127	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 0°C
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	K14	NCTC 3756
<i>Pseudomonas II</i>	38	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 10°C
<i>Pseudomonas II</i>	131	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 0°C
<i>Pseudomonas III-IV</i>	35	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 10°C
<i>Pseudomonas III-IV</i>	76	skemmdur þorskur (hold) geymdur við -2°C
<i>Pseudomonas III-IV</i>	277	skemmt þorskflak geymt í MAP <sup>1</sup> við 0°C
<i>Pseudomonas III-IV</i>	286	skemmt þorskflak geymt í MAP <sup>1</sup> við 0°C
<i>Shewanella putrefaciens</i>	92	skemmdur þorskur (hold) geymdur við -2°C
<i>Shewanella putrefaciens</i>	126	skemmdur þorskur (hold) geymdur við 0°C
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	P-100	þorskflak geymt í MAP við 0°C (Dalgaard, 1995)
<i>Aeromonas-like</i>	91	skemmdur þorskur (hold) geymdur við -2°C
<i>Vibrio alginolyticus</i>	K1	NCIMB 1903
<i>Vibrio aestuarinus</i>	K2	LMG 7909T

1: MAP = 60% CO<sub>2</sub> / 20% N<sub>2</sub> / 20% O<sub>2</sub>

*b) Mælingar á heildarörverufjölda ýsuflaka (geymd í lofti og gaspökkuð):*

Fisksýnin, bæði úr þorskflökum sem voru geymd í lofti eða gaspökkuð, voru tekin reglulega á geymslutímabilinu, undirbúin eins og venjulega, tífoldar þynningar gerðar í kældum þynningarvökva MRD og sýnin möguð í 1 mín. Einn ml af hverju sýni var skammtaður í 3 Malthus sellur og sýnin ræktuð í Malthus tæki (15°C) þar til DT fékkst. Einnig var heildarörverufjöldi sýnanna mældur á "modified Long & Hammer's" (LH) æti (Van Sprekens, 1974) sem var ræktað í þrísýni við 15°C í 5 daga. Staðalkúrfa fékkst með því að bera saman DT niðurstöðurnar og heildarörverutalningar. Þessi samanburður mun gera okkur kleift að áætla heildarörverufjölda svipaðra sýna út frá DT mælingunum.

#### 2.4. Uppsetning mæliaðferðar til talningar á *Photobacterium phosphoreum* og gerð staðalkúrfu

Þessi mæliaðferð var sett upp samkvæmt Dalgaard o.fl. (1996). PPDM æti (pH 10) var búið til, gerileytt, skammtað í Malthus sellurnar sem voru geymdar yfir nótt við 1-3°C í loftfirrðri krukku (Oxoid HP011AP) fyllt með 100% CO<sub>2</sub>.

a) *Valvísi mæliaðferðarinnar (selectivity) gagnvart nokkrum bakteríutegundum:*

Ræktir (5 daga við 5°C) af mismunandi bakteríustofnum (Tafla 1) voru þynntar 1000-falt (10 µl þynnt í 10 ml kælt MRD), hálfur (0,5) ml af hverjum stofni (eða blöndu) skammtaður í 3 sellur, koldíoxíð blásið í sellurnar, elektróðurnar og tapparnir settir á um leið, og sellurnar látnar í Malthus baðið (15°C). Fleiri þynningum (10<sup>-1</sup> til 10<sup>-8</sup>) af *P. phosphoreum* (P-100) var sáð í 3 Malthus sellur. Upplýsingar um sýnin voru skráðar í tölvu. Þegar svörun fékkst var tímalengdin (DT) fyrir hvert sýni skráð niður. Þetta var gert til að athuga hversu sérhæft þetta æti væri, sem sagt hvort helstu bakteríutegundir sem einangrast úr skemmdum fiski ásamt öðrum tegundum næðu að fjölga sér í þessu æti og hvaða DT fékkst fyrir hverja bakteríutegund. Einnig var fjöldi stofnanna mældur á LH æti (15°C, 4 daga) og Spiral tækið notað til sáningar. Þessar talningar voru gerðar til að tryggja að engin fölsk, neikvæð svör fengjust, en einnig til þess að safna gögnum til að útbúa staðalkúrfu fyrir *P. phosphoreum*.

b) *Valvísi mæliaðferðarinnar (selectivity) gagnvart náttúrulegri örveruflóru í fiski, einangrun *P. phosphoreum* stofna úr íslenskum sjávarföngum og gerð staðalkúrfu fyrir *P. phosphoreum*:*

Fisksýnin voru undirbúin eins og lýst áður. Hálfur (0,5) ml af hverju sýni var skammtaður í 3 sellur, koldíoxíð blásið í sellurnar, elektróðurnar og tapparnir settir á um leið, og sellurnar látnar í Malthus baðið (15°C). Heildarörverufjöldi (LH æti) var athugaður í Malthus sellunum þegar svörun fékkst fyrir sýnin á 9. (loft) og 20. degi (MAP). Valdar kólóníur (10 fyrir loft sýnin en 20 fyrir MAP sýnin) voru greindar með eftirfarandi prófum: Gram litun og smásjárskoðun, KOH-próf, kvikleiki (hanging drop; næturrækt við 15°C í Supermarine broth), oxidasa-próf, oxun/gerjun glúkósa (Marine OF test), næmni fyrir 0/129 vibriostatic efni. Allir Gram neg.(-) stofnar, gerjandi og 0/129 næmir voru

athugaðir enn frekar hvað varðar notkun D-mannitol (0,2%),  $\beta$ -hydroxybutyrate (0,1%), pyruvate (0,2%) og acetate (0,2%) ásamt gas myndun frá D-glúkósa. Þeir stofnarnir sem gátu ekki notað þessi efni en mynduðu gas með niðurbroti D-glúkósa voru taldir vera *P. phosphoreum*. Haft var danska stofninn (P-100) til samanburðar.

Grunsamlegum stofnum var sáð í Supermarine broth, ræktaðir í 2 daga við 15°C og 2 daga við 4-5°C, ræktin þeirra sett út í PPDM æti og síðan í Malthus tækið eins og lýst fyrir ofan til að kanna hvort DT stofnanna líktist DT fyrir P-100 stofninn. Heildarörverufjöldi í nokkrum ræktum var mældur á LH æti. Í ljós niðurstaðnanna var hlutfall *P. phosphoreum* yfir heildarörveruflóru sem óx í sellunum reiknað út.

Nokkrir *P. phosphoreum* stofnar voru valdir til að safna gögnum vegna gerðar staðalkúrfu. Þeir voru ræktaðir í Supermarine broth við 5°C í 2 daga, þynningar gerðar ( $10^{-1}$  til  $10^{-6}$ ) í kælt MRD og sáning hveggjar þynningar út í 3 sellur með PPDM æti. Heildarfjöldi næturræktanna var mældur á LH æti. Samband fjölda ( $\log_{10}$  fjöldi/ml) og svörunartíma (DT) fyrir íslensku *P. phosphoreum* stofna var borið saman við staðalkúrfu sem gerð var fyrir P-100 stofninn.

## **2.5. Uppsetning mæliaðferðar til talningar á *Pseudomonas* tegundum og gerð staðalkúrfu**

Þessi aðferð til talningar á *Pseudomonas* tegundum var prófuð samkvæmt upplýsingum sem gefnar voru af Malthus framleiðandanum. Þrjú ml af SPYE ætinu voru skammtaðir í Malthus sellur. CFC (Oxoid selective supplement SR103) sem inniheldur ceftrimide, fucidin og cephaloridine var bætt út í ætið til að ná eftirfarandi lokastyrk efnanna: 50, 50 og 250  $\mu\text{g/ml}$ . Sellurnar voru svo geymdar í kæli.

*a) Valvísi mæliaðferðarinnar (selectivity) gagnvart nokkrum bakteríutegundum:*

Ræktir (32 klst við 15°C) af mismunandi bakteríustofnum (Tafla 1) voru þynntar 1000-falt (10  $\mu\text{l}$  þynnt í 10 ml kælt MRD). Einn ml af hverjum stofni (eða blöndu) var skammtaður í 3 sellur, tapparnir settir á og sellurnar látnar í Malthus baðið (15°C).

Upplýsingar um sýnin voru skráðar í tölvu. Þegar svörun fékkst var tímalengdin (DT) fyrir hvert sýni skráð niður. Þetta var gert til að athuga hversu sérhæft þetta æti væri, sem sagt hvort helstu bakteríutegundir sem einangrast úr skemmdum fiski ásamt öðrum tegundum næðu að fjölga sér í þessu æti og hvaða DT fékkst fyrir hverja bakteríutegund. Einnig var fjöldi stofnanna mældur á LH æti (15°C, 5 daga). Þetta var gert til að tryggja að engin fölsk, neikvæð svör fengjust. *Pseudomonas*-CFC æti (Oxoid) var einnig notað til að kanna vöxt mismunandi bakteríutegunda á sérhæfðu (föstu) æti (ræktun við 15°C og 22°C í 3 daga).

*b) Mælingar á fjölda *Pseudomonas* tegunda í ýsuflökum (geymd í lofti og gaspökkuð):*

Einn ml af fisksýnunum (tíufaldar þynningar) var skammtaður í 3 Malthus sellur og sýnin ræktuð í Malthus tæki (15°C) þar til DT fékkst. Einnig var fjöldi *Pseudomonas* tegunda í sýnunum mældur á *Pseudomonas*-CFC æti í þrísýni. Staðalkúrfa fékkst með því að bera saman DT niðurstöðurnar og örverutalningar. Þessi samanburður (staðalkúrfa) mun gera okkur kleift að áætla fjölda *Pseudomonas* tegunda í svipuðum sýnum út frá DT mælingunum.

## **2.6. Endurtekningargæfni mæliaðferðanna (repeatability)**

Endurtekningargæfni hverrar Malthus mæliaðferðar var könnuð með því að mæla tiltekið sýni 10 sinnum (sýninu sáð í 10 sellur) og staðalfrávik reiknað út. Um var að ræða tvær tegundir af sýnum: (1) næturrækt af *Pseudomonas* II tegundum (P2: stofnar 38 og 131) eða *P. phosphoreum* (P-100); og (2) fisksýni, bæði geymd í lofti og gaspökkuð. Sýnin voru þynnt til að hafa bæði lágan ( $10^{1-2}$ /ml) og háan ( $10^{5-6}$ /ml) fjölda örvera til mælingar.

## **2.7. Hittni mæliaðferðanna (accuracy)**

Malthus mæliaðferðirnar voru bornar saman við hefðbundnar aðferðir. Til þess voru mælingar gerðar á fisksýnum geymdum í lofti og gaspökkuðum. Sýnin voru tekin

reglulega og heildarörverufjöldi (TVC, LH) ásamt fjölda *Pseudomonas* tegunda (CFC) mældur á þremur skálum fyrir hverja mæliaðferð við hverja sýnatöku. Sambærilegar mælingar voru framkvæmdar með Malthus aðferðum (SPYE og SPYE-CFC) og 3 eða 5 eða 10 sellur notaðar fyrir hverja mæliaðferð (fyrir hvert sýni) við tiltekna sýnatöku. Hittni Malthus aðferðanna var metin með staðalfrávik í samanburði við heðfbundnar aðferðir.

### 3. NIÐURSTÖÐUR OG UMRÆÐUR

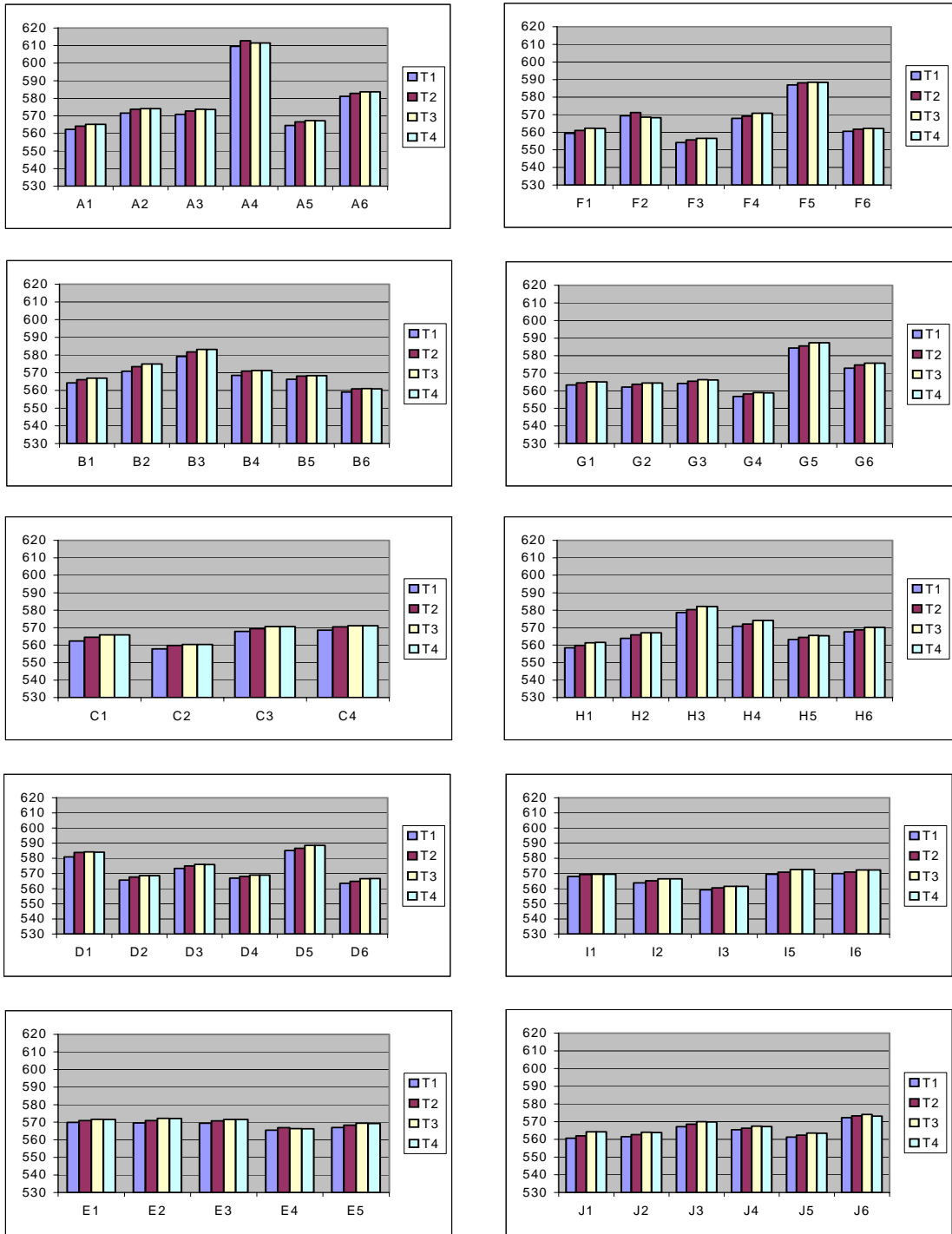
#### 3.1. Grunnathuganir á Malthus tækið

##### a) Svörun Malthus tækisins:

Malthus tækið hafði verið í geymslu í mörg ár og athugað var hvort tækið virkaði rétt og hversu áreiðanleg (endurtekningarhæfni, repeatability) mæligildi voru sem fengust með einfaldri mælingu. Allar sellurnar (56) voru notaðar, en Malthus baðið (M2-60) tekur hámark 60 sellur. Af óskýranlegum ástæðum fengust engar mælingar úr einni sellu (E2). Athugað var hvort þetta sambandsleysi stafaði af tappaum eða sellunni sjálfri (elektróðunni) en ekki virtist svo. Hugsanlegt er að eitthvað hafi gerst í stýrikerfi Malthus tækisins vegna þess að í seinni keyrslu var sambandsleysi í öllum sellunum sem var lagað með því að skipta um "analog digital board (ADB)" í tækinu. Annars voru mælingarnar í hinum 55 sellum áreiðanlegar þar sem % staðalfrávik DT mælinganna var 2,6%. Þetta gildi er á svipuðum nótum og þau gildi sem Dalgaard o.fl. (1996) birtu um endurtekningarhæfni Malthus aðferðarinnar fyrir talningu á *P. phosphoreum* (frá 2,9 til 7,3%).

##### b) Viðnámsmælingar:

Viðnámsmælingar voru gerðar í 56 sellur/hólf. Einnig var athugaður stöðugleiki leiðnimælinganna í sellunum með því að skoða línuritinn sem sjást í tölvunni og samanburður gerður milli sella/hólfa.

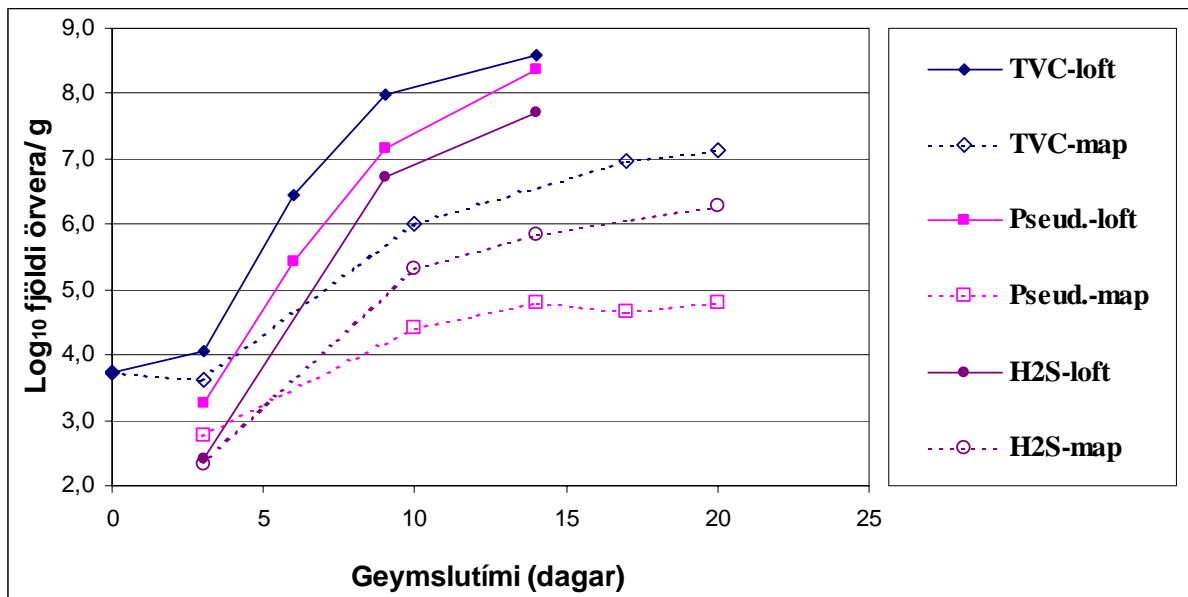


**Mynd 1.** Viðnámsmælingar (ohms) í 56 hólfum/sellum Malthus tækisins (sterílt SPYE æti sett í sellurnar; T1= upphafsgildi, T2= eftir 30 mín, T3= 19 klst og T4=21 klst.)

Þannig kom í ljós að í sumum sellum/hólfum í Malthus bakkanum fengust hærrí viðnámsgildi (hólf A4) og/eða óstöðugar leiðnimælingar (hólf A4, D1 og F2) sem leiddu til sveiflukendra línurita í stað fyrir lárétt og stöðug línurit (niðurstöðurnar ekki sýndar). En að jafnaði voru viðnámsmælingarnar nokkuð stöðugar fyrir hvert hólf/hverja sellu (mynd 1). Ekki var vitað áhrif þessara sveiflna á frekari mælingum, en send var fyrirspurn hvað varðar þetta mál til Malthus fyrirtækisins í Bandaríkjunum. Samkvæmt þjónustuaðilanum voru viðnámsgildin í lagi og bent var á að viðnámsgildi ætisins er háð vatninu, sýrustigi og hitameðferð sem það hefur fengið. Óstöðugar leiðnimælingar gætu stafað af elektróðum eða tengitappanum. Þessi athugun var framkvæmd í kjölfar breytilegra niðurstaðna sem fengust þegar prófuð var aðferðin fyrir heildarörverufjölda (sjá 2.3. -a).

### 3.2. Undirbúningur fisksýna til mats á Malthus mæliaðferðunum

Upprunaleg gæði ýsuflakanna voru góð, með heildarörverufjöldann um 5.420 /g (eða log 3,7/ g). Mynd 2 sýnir niðurstöðurnar fyrir örverufræðilegt mat á flökunum þegar þau voru geymd í lofti og loftskiptum umbúðum (MAP:60% CO<sub>2</sub>/40% N<sub>2</sub>) á geymslutímanum.



**Mynd 2.** Örverufræðilegt mat á flökunum geymd í lofti og loftskiptum umbúðum (TVC= heildarörverufjöldi við 15°C; *Pseudomonas* fjöldi; H<sub>2</sub>S: fjöldi H<sub>2</sub>S-myndandi örvera)

### 3.3. Uppsetning Malthus mæliaðferðar til mats á heildarörverufjölda fiskafurða og gerð staðalkúrfu

a) Mælingar á nokkrum bakteríutegundum:

Tafla 2 sýnir niðurstöðurnar sem fengust þegar ræktir af mismunandi bakteríutegundum voru notaðar til að prófa SPYE æti í Malthus tækinu og kanna hvort helstu bakteríutegundir sem einangrast úr skemmdum fiski ásamt öðrum tegundum næðu að fjölga sér í þessum æti. Einnig voru hefðbundnar talningar gerðar til að bera saman sáðan fjölda og svörunartíma (detection time, DT) Malthus tækisins fyrir hverja bakteríutegund.

Svörunartíminn fyrir flestar fiskibakteríur var um 25-32 klst þegar frumumagnið var um rúmlega 1.000.000/ml, en þessi svörunartími er háður örverufjölda sýna. Einn bakteríuhópur (P3) óx hægar í SPYE ætinu og varð DT-gildi þess hærra (76 klst.). Þessi hópur hafði verið einangraður úr holdi skemmdra þorska sem höfðu verið geymdir í lofti við -2°C og 10°C. Það er athyglisvert að bakteríustofnar úr sami hópi (P4) uxu miklu hraðar og varð þá DT-gildið lægri, en þessir stofnar voru einangraðir úr skemmdu, pökkuðu (MAP) þorskflaki.

**Tafla 2.** DT mælingar og sáður fjöldi (LH, 15°C) fyrir nokkrar bakteríutegundir

Bakteríutegund	DT (klst)	% DT- staðalfrávik	Sáður fjöldi per ml
<i>Pseudomonas</i> I (P1)	31,5	6,2	2,85 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pf)	28,2	0,5	1,83 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas</i> II (P2, lægra frumumagn)	45,5	4,2	6,50 x 10 <sup>3</sup>
<i>Pseudomonas</i> II (P2, hærra frumumagn)	28,8	4,4	6,50 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas</i> III-IV (P3)	76,0	0	7,32 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas</i> III-IV (P4)	25,2	–	6,10 x 10 <sup>6</sup>
<i>Shewanella putrefaciens</i> (Sp)	25,4	7,5	6,91 x 10 <sup>6</sup>
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (P-100)	25,9	4,7	2,24 x 10 <sup>6</sup>
<i>Aeromonas</i> -like (A)	> 113	–	1,83 x 10 <sup>6</sup>
<i>Vibrio alginolyticus</i> (K1)	> 113	–	1,83 x 10 <sup>6</sup>
<i>Vibrio aestuarinus</i> (K2)	> 113	–	6,10 x 10 <sup>5</sup>

Aðrar bakteríutegundir (A, K1 og K2) uxu en hægar og varð svörunartíma þeirra ekki náð þegar mælingunni var lokið (eftir 113 klst.). Þessar niðurstöður benda til þess að við notkun SPYE ætisins til mats á heildarörverufjölda fiskafurða verður svörunartíminn háður fjölda vissara bakteríuhópa, eins og *Pseudomonas* hópa, *S. putrefaciens* og *P. phosphoreum*. En þessir hópar eru taldir vera skemmdarvaldar fiskafurða (Gram og Huss, 1996). Einnig má geta að staðalfrávik fyrir DT-mælingarnar voru innan við þau mörk sem Dalgaard o.fl. (1996) birtu. Þessar niðurstöður sýna að SPYE ætið ætti að gefa raunverulegt mat um heildarörverufjölda í fiskafurðum eftir geymslu/pökkunaraðferðum.

*b) Mælingar á heildarörverufjölda ýsufłaka (geymd í lofti og gaspökkuð):*

Vitað er að samsetning skemmdarörvera í fiskafurðum er háð ýmsum innri sem ytri þáttum, aðallega geymsluskilyrðum. Vegna þess að forathuganir á notkun SPYE ætisins til mats á heildarörverufjölda (15°C) fiskafurða sýndu að svörunartíminn (DT) væri háður fjölda vissara bakteríuhópa, mætti búast við að það þyrfti að hafa sér staðalkúrfu fyrir hverju geymslu/pökkunaraðferð. Þetta er vegna þess að mismunandi örverutegundir verða ríkjandi eftir völdum geymsluskilyrðum. Við gerð staðalkúrfu (mynd 3) eftir mælingar á fíksýnum kom í ljós að svörunartíminn var styttri fyrir fisk sem var geymdur í lofti en í MAP þegar örverufjöldinn var kominn yfir 316.000/g (log 5,5/g).

Við **loftskilyrði** fékkst eftirfarandi staðalkúrfa:

$$\text{Log fjöldi örvera/g} = (-0,1425 * DT) + 9,2972 \quad R^2 = 0,9748$$

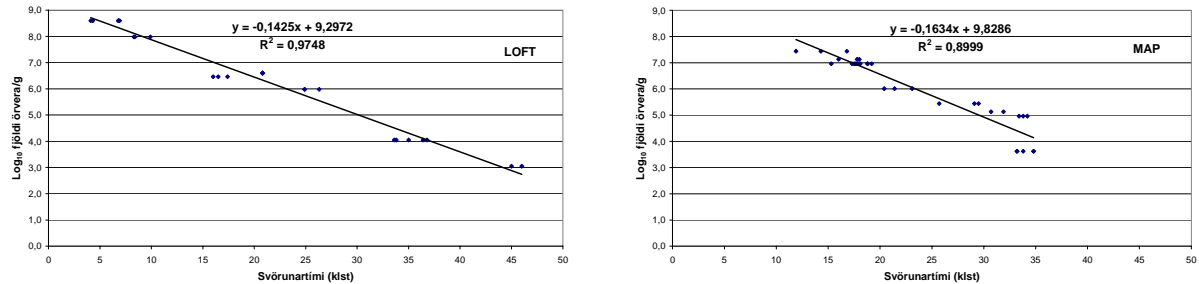
Með þessari staðalkúrfu er hægt að áætlað heildarörverufjöldann fyrir sýnin sem liggja á bilinu 1.000 til 316.000.000/g. Til að túlka þessa jöfnu getum við sagt að það taki um 37,2 klst til að fá svörun fyrir heildarörverufjöldann (15°C, kuldakærar bakteríur) í ferskum flökum með u.þ.b. 10.000/g, en ekki nema 16,1 klst þegar fjöldinn hefur náð 10.000.000/g.

Fyrir **gaspökkuð ýsufłök** fékkst eftirfarandi staðalkúrfa:

$$\text{Log fjöldi örvera/g} = (-0,1634 * DT) + 9,8286 \quad R^2 = 0,8999$$

Með þessari staðalkúrfu er hægt að áætlað heildarörverufjöldann fyrir MAP sýnin sem liggja á bilinu 1.0000 til 100.000.000/g. Til að túlka þessa jöfnu getum við sagt að það

taki um 35,7 klst til að fá svörun fyrir heildarörverufjöldann (15°C) í ferskum flökum með u.þ.b. 10.000/g, en ekki nema 17,3 klst þegar fjöldinn hefur náð 10.000.000/g.



**Mynd 3.** Línulegt samband heildarörverufjölda (LH, 15°C) og svörunartíma (DT, Malthus-SPYE æti) fyrir ýsuflök geymd í lofti og í loftskiptum umbúðum (MAP: 60% CO<sub>2</sub>/ 40% N<sub>2</sub>) við 0-2°C

Svörunartíminn (DT), sem fékkst með SPYE ætinu fyrir flökin geymd í lofti og loftskiptum umbúðum, er gefinn í Töflu 3 ásamt % frávikum. Einnig er heildarörverufjöldi áætlaður út frá ofangreindum staðalkúrfum, og heildarörverufjöldinn (LH æti, 15°C) sýndur til samanburðar.

**Tafla 3.** Svörunartími SPYE ætisins og frávik þess fyrir fisk eftir geymsluaðferðum

Geymslu- aðferð	Geymslutími (dagar)	Svörunartími (DT, klst)	% DT frávik	Áætlaður heildarörverufjöldi* (log/ g)	Heildarörveru- fjöldi (log/ g) (LH)
<b>Loft</b>	3	38,7	3,3	4,29	4,05
	6	23,1	10,7	6,93	6,46
	9	22,2	2,6	8,03	7,98
	14	16,0	8,7	8,47	8,60
<b>MAP</b>	3	37,4	2,3	4,28	3,62
	10	20,4	1,0	6,29	6,01
	14	15,9	9,4	7,49	7,44
	17	16,9	6,7	6,96	6,96
	20	19,0	1,4	7,13	7,13

\* Fjöldi áætlaður út frá ofangreindum staðalkúrfum

### 3.4. Uppsetning mæliaðferðar til talningar á *Photobacterium phosphoreum* og gerð staðalkúrfu

a) Valvísi mæliaðferðarinnar (*selectivity*) gagnvart nokkrum bakteríutegundum:

Tafla 4 sýnir niðurstöðurnar sem fengust þegar ræktir af mismunandi bakteríutegundum voru notaðar til að kanna valvísi PPDM ætisins í Malthus tækinu gagnvart mismunandi bakteríutegundum. PPDM ætið var sérstaklega þróað til að meta fjölda *Photobacterium phosphoreum* og á þess vegna að vera valæti. Einnig voru hefðbundnar talningar gerðar til að bera saman sáðan fjölda og svörunartíma (DT) Malthus tækisins fyrir hverja bakteríutegund.

**Tafla 4.** DT mælingar og sáður fjöldi (LH, 15°C) fyrir nokkrar bakteríutegundir

Bakteríutegund	DT (klst)	% DT- staðalfrávik	Sáður fjöldi per ml
<i>Pseudomonas</i> I (P1)	59,4	10,6	6,91 x 10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pf)	74,2	4,6	1,20 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas</i> II (P2)	52,5	16,0	1,22 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas</i> III-IV (P3, lægra frumumagn)	123,8	1,3	3,09 x 10 <sup>3</sup>
<i>Pseudomonas</i> III-IV (P3, hærra frumumagn)	110,2	0,2	3,09 x 10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas</i> III-IV (P4)	97,0	7,9	3,60 x 10 <sup>6</sup>
<i>Shewanella putrefaciens</i> (Sp)	29,7	8,4	2,42 x 10 <sup>7</sup>
<i>Shewanella putrefaciens</i> (Sp)	<b>37,8</b>	10,5	<b>4,09 x 10<sup>6</sup></b>
<i>Shewanella putrefaciens</i> (Sp)	45,7	4,0	2,42 x 10 <sup>5</sup>
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (P-100, lægra frumumagn)	<b>39,2</b>	2,1	<b>1,02 x 10<sup>3</sup></b>
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (P-100, hærra frumumagn)	<b>19,8</b>	3,8	<b>1,02 x 10<sup>6</sup></b>
<i>Aeromonas</i> -like (A)	> 115	–	4,98 x 10 <sup>6</sup>
<i>Vibrio alginolyticus</i> (K1)	53,3	11,9	1,57 x 10 <sup>6</sup>
<i>Vibrio aestuarinus</i> (K2)	48,8	–	1,85 x 10 <sup>6</sup>

Svörunartíminn fyrir *P. phosphoreum* P-100 var að meðaltali 19,4 klst fyrir næturrækt sem var um milljón frumur/ml. Þessi svörunartími var um tvisvar til 5 sinnum hraðari en DT fyrir sambærilegan fjölda annarra fiskibaktería. En þess má geta að svipaður svörunartími fékkst fyrir

Þúsund sinnum minna frumumagn af P-100 (39,2 klst) en fyrir *Shewanella putrefaciens* (37,8 klst) stofna. Þessar niðurstöður sýna annars vegar að PPDM er gott valæti fyrir ákvörðun á fjölda *P. phosphoreum* þegar þessi baktería finnst í ríkjandi mæli eða er í háu hlutfalli miðað við örveruflórana (eins og til dæmis í MAP fiski).

Hins vegar er hugsanlegt að í öðrum tilfellum þar sem samsetning örveruflórunnar væri öðruvísi gætu fölsk jákvæð svör fengist. Þetta gæti gerst ef fjöldi *P. phosphoreum* yrði meira en þúsund sinnum lægri (> 3 log munur) en fjöldi *Shewanella putrefaciens*. Þar sem *S. putrefaciens* finnst í fiski geymdum við loftskilyrði gæti návist þessarra baktería truflað mælingar á slíkum sýnum. Þá er mikilvægt að áætla fjölda *S. putrefaciens* (út frá fjölda H<sub>2</sub>S-myndandi baktería) til að finna hvort svörunartíminn samsvari fjölda H<sub>2</sub>S-myndandi baktería. Til þess er hægt að nota eftirfarandi línulegt samband og bera saman áætlaðan fjölda *S. putrefaciens* (út frá DT með PPDM ætið) með fjölda H<sub>2</sub>S-myndandi baktería (á IA ætinu):

$$\text{Log fjöldi } S. \textit{putrefaciens} / \textit{g} = (-0,1245 * \textit{DT}) + 11,154 \quad R^2 = 0,9806$$

Einnig er hægt að fá staðfest úr jákvæðum PPDM sellum hvort *S. putrefaciens* (H<sub>2</sub>S-myndandi bakteríur) trufla mælinguna. Það er gert með því að taka sýni úr völdum PPDM sellunum þegar svörun hefur nýlega mælst, og setja það á LH og IA skálar til að rækta samkvæmt hefðbundinni aðferð og meta hlutfall H<sub>2</sub>S-myndandi baktería (IA) í heildarflórunni (LH, væntalega ríkjandi í *Photobacterium phosphoreum*) í sellunum.

Með frekari notkun Malthus-PPDM aðferðarinnar kom í ljós að æskilegt var að geyma sellurnar í 15°C ræktunarskáp í 1-2 klst eftir sáningu áður en þær voru settar í Malthus baðið. Þetta var gert til þess að ná jafnvægi milli vökva- og gasfasanna vegna notkunar CO<sub>2</sub> í sellunum. Annars komu stundum fram truflarnir í aflestrinum sem höfðu áhrif á túlkun niðurstaðna.

*b) Valvísi mæliaðferðarinnar (selectivity) gagnvart náttúrulegri örveruflóru í fiski, einangrun P. phosphoreum stofna úr íslensku sjávarfangi og gerð staðalkúrfu fyrir P. phosphoreum:*

Svörunartíminn (DT) sem fékkst með PPDM ætinu fyrir flökin sem voru geymd í lofti og loftskiptum umbúðum er gefinn í Töflu 5 ásamt % frávikum. Einnig var fjöldi *P. phosphoreum* áætlaður út frá staðalkúrfu sem verður lýst á eftir, og heildarörverufjöldinn sýndur til samanburðar.

**Tafla 5.** Svörunartími PPDM ætisins og frávik þess fyrir fisk eftir geymsluaðferðum

Geymslu- aðferð	Geymslutími (dagar)	Svörunartími (DT, klst)	% DT frávik	Áætlaður <i>P.</i> <i>photob.</i> fjöldi* (log/ g)	Heildarörveru- fjöldi (log/ g) (LH)
<b>Loft</b>	3	38,7	3,3	4,42	4,05
	6	23,1	10,7	6,37	6,46
	9	22,2	2,6	6,49	7,98
	14	16,0	8,7	7,27	8,60
<b>MAP</b>	3	37,4	2,3	4,58	3,62
	10	20,4	1,0	6,71	6,01
	14	15,9	9,4	7,29	7,44
	17	16,9	6,7	7,15	6,96
	20	19,0	1,4	6,89	7,13

\* Fjöldi áætlaður út frá staðalkúrfu :  $\log \text{ fjöldi / ml eða g} = -0,1256 \cdot \text{DT} + (8,2771 + \log (\text{þynningarfaktor}))$

Svörunartíminn var innan við 39 klst. fyrir fjölda um 2.600/ g (eða log 3,42/g). Frávik svörunartímans á geymslutímabilinu var frá 1,0-10,7%. Þessi mismunur getur stafað af breytileikanum sem myndast milli sellu vegna gasmagnsins sem leyst er í ætinu og tapast þegar sellurnar eru opnaðar fyrir sáningu. Þetta hefur áhrif á sýrustig ætisins og þar af leiðandi á vaxtarhraða bakteríanna og leiðnimælingarnar. Mikilvægt er að hafa ætið sem kaldast við sáningu til að tryggja að minnsta kolsýra tapist og endurtekningarhæfni aðferðarinnar verði góð.

Það er athyglisvert að vaxtarhraði *P. phosphoreum* virtist vera svipaður fyrstu 14 daga hvort sem fiskurinn var geymdur í lofti eða í loftskiptum umbúðum (MAP), auk þess að þessi baktería fannst í ríkjandi mæli óháð geymsluaðferðunum. Aftur á móti var hlutfall *P. phosphoreum* í skemmdarflórunni hærra undir MAP (um 57%) en í lofti (um 5%). Samkvæmt talningu H<sub>2</sub>S-myndandi baktería er óhugsanlegt að þessi hópur hafi truflað mælingunni fyrir loft-fiskinn og gefið fölsk jákvæð svör. Einnig hefur einangrun úr jákvæðum PPDM sellum sýnt að heildarörverufjöldi í jákvæðum sellum var yfir 100.000.000/ml en fjöldi H<sub>2</sub>S-myndandi baktería ekki nema um 100.000-1.000.000/ ml fyrir loft fiskinn (á 9. degi) en fyrir MAP-fiskinn var heildarfjöldi í jákvæðum sellum yfir 1.000.000/ml á meðan fjöldi H<sub>2</sub>S-myndandi baktería var minni en 20.000/ml. Stórar ljós brúnar kólóníur einangraðust úr jákvæðum sellum fyrir MAP-fiskinn, en þær voru um 2,4% af heildarflórunni.

**Tafla 6.** Niðurstöður fyrir greiningu úr PPDM jákvæðum sellum

	Einangrun úr jákvæðri PPDM sellu	
	MAP-fiskur	Loft-fiskur
Fjöldi valdra kólónía	20	10
Fjöldi lifandi stofna	13	7
Fjöldi líklegra <i>P. phosphoreum</i> stofna	13 (100%)	4 (57,1%)
Fjöldi jákvæðra stofna (MALTHUS)	13	4

Til að kanna valvísi mæliaðferðarinnar gagnvart náttúrulegri örveruflóru í fiski voru stofnar einangraðir úr jákvæðri sellu fyrir báðar geymsluaðferðir, á 9. (loft) og 20. degi (MAP) geymslutímans. Tafla 6 sýnir annars vegar að 100% (13/13) og 57,1% (4/7) stofnanna sem einangraðir voru úr MAP- og loft-fiski voru taldir vera *P. photobacterium* samkvæmt hefðbundinni greiningu. Þegar líklegir *P. photobacterium* stofnar voru ræktaðir í PPDM ætinu í Malthus tækinu fékkst jákvæð svörun eins og mátti búast við. Þannig að valvísi PPDM ætisins fyrir vöxt/talningu *P. phosphoreum* í fisksýnum er talin vera mjög góð fyrir fisk geymdan í loftskiptum umbúðum, og nægileg fyrir fisk geymdan í lofti þar sem yfir 50% einangraðra stofna voru taldir vera *P. phosphoreum*.

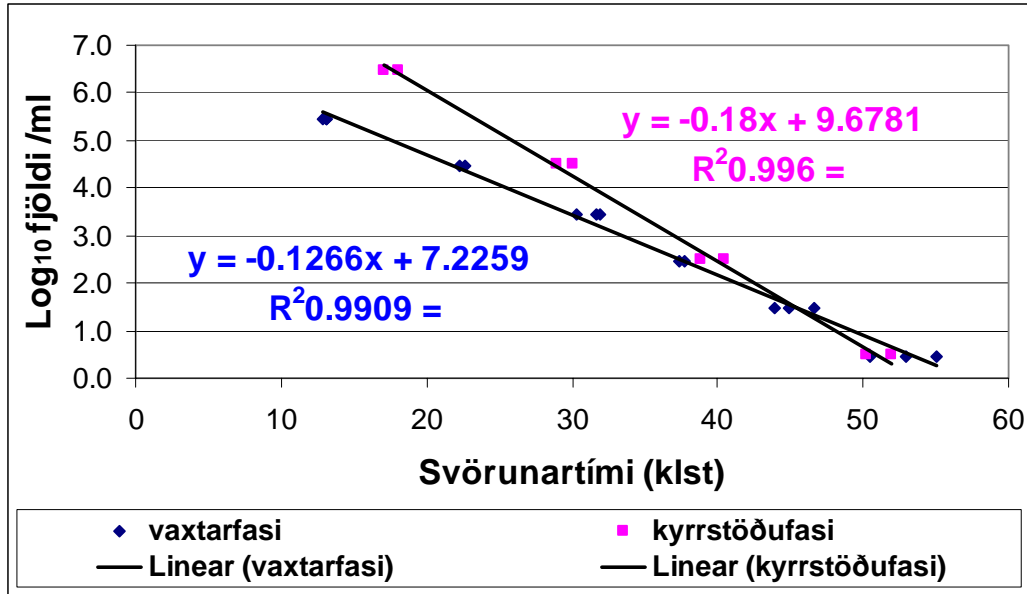
Í greininni þeirra Dalgaard og fl. (1996) er staðalkúrfan fyrir *P. phosphoreum* stofna (kokkteil) eftirfarandi:

$$\text{Log fjöldi } P. \text{ phosphoreum /ml} = (-0,175 \cdot \text{DT}) + (8,37 + \log (\text{þynningarfaktor}))$$

$$R^2 = 0,981$$

Þegar danski stofninn P-100 var ræktaður við okkar aðstæður, þ.e.lágt hitastig (5°C), fengust tvær staðalkúrvur eftir því hvort frumurnar voru í vaxtarfasa (þ.e. rækt um log 6,5/ ml) eða í kyrrstöðufasa (þ.e. rækt um log 9/ ml). Mynd 4 sýnir að fyrir sama svörunartíma (DT < 46 klst.) verður áætlaður fjöldi *P. phosphoreum* hærrí þegar miðað er við frumur sem eru í kyrrstöðufasanum. Þessi mismunur sýnir að lífeðlisfræðilegt ástand stofnanna hefur áhrif á gerð staðalkúrfunnar. Þess má geta að svipuð hallatala (0,180) hefur fengist fyrir P-100 stofninn í kyrrstöðufasanum og fyrir kúrfu Dalgaard og fl. (1996) (0,175), en *P. phosphoreum* “kokkteillinn” sem þeir notaðu hafði verið ræktaður við 15°C og hugsanlega einnig í kyrrstöðufasanum. Hins vegar er skurðpunkturinn fyrir P-100 stofninn ræktaðan við okkar

aðstæður hærri en sá fyrir danska kokkteilinn (9,68 vs. 8,37). Þetta þýðir að fyrir sama fjölda fruma var svörunartími danska kokkteilsins styttri en fyrir P-100 í mælingunum hér. Þetta getur stafað af mismunum milli tilraunastofna (t.d. innri og ytri ástæðum Malthus aðferðarinnar) og ræktunarskilyrðum sem notuð voru til að forrækta danska kokkteilinn (15°C).

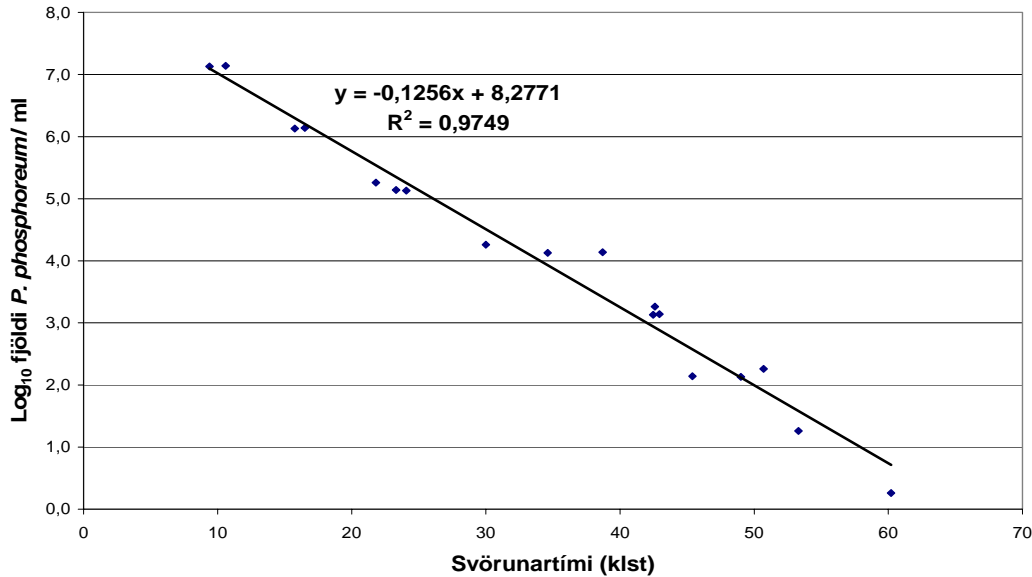


**Mynd 4.** Staðalkúrfur fyrir *Photobacterium phosphoreum* P-100 í vaxtar- og kyrrstöðufasa

Staðalkúrfan fyrir íslenska *P. phosphoreum* stofna (mynd 5) var fengin með því að rækta við lágt hitastig (5°C í 2 daga) þrjá stofna sem voru einangraðir úr MAP-fiski. Þetta var gert til þess að líkja eftir lífeðlisfræðilegu ástandi vaxandi stofna í fisksýnum.

$$\text{Log fjöldi } P. \text{ phosphoreum/ g} = (-0,1256 * DT) + (8,2771 + \log (\text{þynningarfaktor}))$$

$$R^2 = 0,9749$$



**Mynd 5.** Línulegt samband fjölda íslenskra *P. phosphoreum* stofna og svörunartímans (PPDM, Malthus)

Eins og fyrir kúrfu P-100 stofnsins í vaxtarfasanum er þessi staðalkúrfu með lægri hallatölu, en hærri skurðpunkt. Þessi munur getur verið vegna minna þols íslenskra stofna gagnvart kolsýru og þess vegna hægari vaxtar í PPDM sellunum (sem sagt lengri svörunartími miðað við ákveðinn fjölda). Með þessari staðalkúrfu er hægt að áætlað fjölda *P. phosphoreum* í ferskum fiski á bilinu 20 frumur til 126.000.000/g (DT = 63,5 niður í 9,4 klst). Til að túlka þessa jöfnu getum við sagt að við svörunartíma um 34,1 klst verður fjöldi *P. phosphoreum* um 100.000/g.

### 3.5. Uppsetning mæliaðferðar til talningar á *Pseudomonas* tegundum og gerð staðalkúrfu

a) Valvísi mæliaðferðarinnar (*selectivity*) gagnvart nokkrum bakteríutegundum:

Tafla 7 sýnir niðurstöðurnar sem fengust þegar ræktir af mismunandi bakteríutegundum voru notaðar til að kanna valvísi SPYE-CFC ætisins í Malthus tækinu gagnvart mismunandi bakteríutegundum.

**Tafla 7.** DT mælingar og sáður fjöldi (LH, 15°C) fyrir nokkrar bakteríutegundir

Bakteríutegund	DT (klst.)	% DT- staðalfrávik	Sáður fjöldi (fjöldi/ml)
<i>Pseudomonas</i> I (P1)	32,9	3,7	5,49 x 10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Pf)	33,8	2,1	5,49 x 10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas</i> II (P2, lægra frumumagn)	73,9	3,2	4,27 x 10 <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas</i> II (P2, hærra frumumagn)	51,4	0,6	4,27 x 10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas</i> III-IV (P3)	> 203	–	6,10 x 10 <sup>5</sup>
<i>Pseudomonas</i> III-IV (P4)	> 203	–	7,93 x 10 <sup>5</sup>
<i>Shewanella putrefaciens</i> (Sp)	> 203	–	1,28 x 10 <sup>6</sup>
<i>Photobacterium phosphoreum</i> (P-100)	> 203	–	2,44 x 10 <sup>5</sup>
<i>Aeromonas</i> -like (A)	> 203	–	1,02 x 10 <sup>5</sup>
<i>Vibrio alginolyticus</i> (K1)	> 203	–	2,03 x 10 <sup>5</sup>
<i>Vibrio aestuarinus</i> (K2)	> 203	–	1,42 x 10 <sup>5</sup>

SPYE-CFC ætið á að vera sérhæft til talningar á *Pseudomonas* tegundum. Einnig voru hefðbundnar talningar gerðar (LH æti, 15°C) til að bera saman fjölda og svörunartíma (DT) Malthus tækisins fyrir hverja bakteríutegund. Svörun fékkst eingöngu fyrir *Pseudomonas* tegundir úr hópnum I og II. Svörunartíminn fyrir hóp I var styttri (33-34 klst.) en fyrir hóp II (51 klst.) við sambærilegan fjölda. Vöxtur allra hinna bakteríutegundanna var greinilega hindraður. *Pseudomonas* hópur III-IV náði ekki að vaxa í þessu æti, en vitað er að þessi hópur finnst ekki í ríkjandi mæli í skemmdum fiski sem er geymdur í lofti (Einarsson o.fl., 1996).

Þessar niðurstöður sýna að valvísi SPYE-CFC ætisins er mikil og mun svörunartíminn gefa til kynna fjölda *Pseudomonas* I og/eða II hópa, en hlutfall þessara hópa mun ekki vera augljóst. *Pseudomonas*-CFC æti (Oxoid) var notað til að kanna vöxt mismunandi bakteríutegunda á sérhæfðu æti (ræktun við 15°C og 22°C í 3 daga). Vitað var að *Shewanella putrefaciens* vex ekki á þessu sérhæfðu æti og var það staðfest við 15°C og 22°C eftir 3 daga ræktun. Aftir á móti kom í ljós að nokkrir stofnar *P. phosphoreum* uxu við 15°C en ekki við 22°C. Þess vegna var ræktunin höfð við 22°C við talningu á *Pseudomonas* tegundum í fiski.

b) Mælingar á fjölda *Pseudomonas* tegunda í ýsuflökum (geymd í lofti og gaspökkuð): Svörunartíminn (DT) sem fékkst með SPYE-CFC ætinu fyrir flökin sem voru geymd í lofti og loftskiptum umbúðum er gefinn í Töflu 8. Einnig var fjöldi *Pseudomonas* tegunda fenginn með hefðbunda sáningu á CFC æti.

**Tafla 8.** Svörunartími SPYE-CFC ætisins og frávik þess fyrir fisk eftir geymsluaðferðum

Geymslu- aðferð	Geymslutími (dagar)	Svörunartími (DT, klst)	% DT frávik	Áætlaður	<i>Pseudomonas</i>
				<i>Pseudomonas</i> fjöldi (log/ g)*	fjöldi (log/ g) (CFC)
<b>Loft</b>	3	59,7	1,8	3,11	3,26
	6	48,9	2,2	5,77	5,42
	9	44,6	0,0	6,83	7,15
	14	39,8	0,3	8,00	8,36
<b>MAP</b>	3	63,0	2,1	2,96	2,76
	10	42,1	1,0	4,61	4,42
	14	39,7	1,7	4,80	4,81
	17	42,6	5,0	4,57	4,67
	20	39,3	3,7	4,83	4,79

\* Fjöldi áætlaður fyrir fisk (loft) út frá staðalkúrfu:  $\log \text{ fjöldi/g} = -0,246 \cdot \text{DT} + 17,799$ ; en fyrir MAP-fiskinn út frá staðalkúrfu:  $\log \text{ fjöldi/g} = -0,0789 \cdot \text{DT} + 7,9291$

Eins og getið var áður er samsetning skemmdarörvera í fiskafurðum háð ýmsum innri sem ytri þáttum, aðallega geymsluskilyrðum. Til dæmis er vitað að vöxtur *Pseudomonas* tegunda, sérstaklega hópa I-II, fer hratt við loftskilyrði en verður hindraður í súrefnisskert umhverfi. Hins vegar hefur komið í ljós að *Pseudomonas* tegundir úr hópum III-IV ná að fjölga sér í loftskiptu umhverfi (Einarsson o.fl., 1996). Vegna þess að forathuganir á notkun SPYE-CFC ætisins til mats á fjölda *Pseudomonas* tegunda sýndu að einungis *Pseudomonas* tegundir úr hópum I-II ná að vaxa í þessum æti, en ekki stofnarnir úr hópnum III-IV, er fyrirsjáanlegt að rangt mat gæti fengist við notkun SPYE-CFC til ákvörðunar á fjölda *Pseudomonas* tegunda í MAP-fiski. Eðlilega hefur samsetning gasblöndunnar einnig áhrif á útkomunni. Staðalkúrfa var gerð fyrir hverju geymsluaðferð.

Við loftskilyrði fékkst eftirfarandi staðalkúrfu:

$$\text{Log fjöldi örvera/g} = (-0,246 \cdot \text{DT}) + 17,799 \quad R^2 = 0,9637$$

Með þessari staðalkúrfu er hægt að áætlað *Pseudomonas* fjöldann fyrir sýnin sem liggja á bilinu 200 til 22.900.000/g. Til að túlka þessa jöfnu getum við sagt að það taki um 56,1 klst til að fá svörun um fjölda *Pseudomonas* tegunda í ferskum flökum með u.þ.b. 10.000/g, en ekki nema 39,8 klst þegar fjöldinn hefur náð 10.000.000/g.

Fyrir gaspökkuð ýsuflök fékkst eftirfarandi staðalkúrfu:

$$\text{Log fjöldi örvera/g} = (-0,0789 \cdot \text{DT}) + 7,9291 \quad R^2 = 0,9631$$

Með þessari staðalkúrfu er einungis hægt að áætlað *Pseudomonas* fjöldann fyrir MAP (60% CO<sub>2</sub> / 40% N<sub>2</sub>) sýnin sem liggja á bilinu 470 til 65.000/g. Til að túlka þessa jöfnu getum við sagt að það taki um 62,5 klst til að fá svörun um fjölda *Pseudomonas* tegunda í ferskum flökum með u.þ.b. 1.000/g, en ekki nema 40,9 klst þegar fjöldinn hefur náð 50.000/g.

Staðalfrávik svörunartímans fyrir mælingu á fjölda *Pseudomonas* tegunda var á bilinu 0-2% fyrir loft-fiskinn, en 1-5% fyrir MAP-fiskinn (tafla 8). Minni frávik fengust með þessari aðferð í samanburði við aðferðina til mats á fjölda *P. phosphoreum*. Skýringin er væntalega sú að auðveldara er að staðla þessa SPYE-CFC aðferð þar sem engin kolsýra er notuð auk þess að mjög takmörkuð örveruflóra nær að vaxa í ætinu.

### 3.6. Endurtekningaráhræfni mæliaðferðanna (repeatability)

Tafla 9 sýnir frávikin (% af svörunartímanum) sem fengust við mælingar á:

- fjölda *Pseudomonas* tegunda með SPYE-CFC ætinu í hreinrækt (P2) og í MAP-fiski
- fjölda *Photobacterium phosphoreum* með PPDM ætinu í hreinrækt (P-100)
- heildarörverufjölda í MAP-fiski með SPYE ætinu.

**Tafla 9.** Endurtekningarhæfni (% staðalfrávik) mæliaðferðanna

Tegund mælingar /æti (bakteríur, sýni)	DT (klst.)	% DT- staðalfrávik	Mældur fjöldi* (fjöldi/ml eða g)
<i>Pseudomonas</i> fjöldi / SPYE-CFC (P2, lægra frumumagn)	73,9	3,2	4,27 x 10 <sup>2</sup>
<i>Pseudomonas</i> fjöldi / SPYE-CFC (P2, hærra frumumagn)	51,4	0,6	4,27 x 10 <sup>5</sup>
<i>P. phosphoreum</i> fjöldi / PPDM (P-100, lægra frumumagn)	39,2	2,1	1,02 x 10 <sup>3</sup>
<i>P. phosphoreum</i> fjöldi / PPDM (P-100, hærra frumumagn)	19,8	3,8	1,02 x 10 <sup>6</sup>
Heildarörverufjöldi / SPYE (MAP-fiskur)	17,8	6,1	9,15 x 10 <sup>6</sup>
<i>Pseudomonas</i> fjöldi / SPYE-CFC (MAP-fiskur)	42,6	5,0	4,68 x 10 <sup>4</sup>

\* Mældur fjöldi með hefðbundinni aðferð

Endurtekningarhæfnin var á bilinu 0,6 til 6,1% fyrir þessar 3 mismunandi aðferðir. Þetta er í samræmi við gildin (2,9-7,3%) sem Dalgaard o.fl. (1996) birtu fyrir PPDM ætið, en betri endurtekningarhæfni (1,9-3,3%) fékkst við mælingu á *E. coli* í skelfiski með leiðnitækni við 44°C (Dupont o.fl., 1994). Það er hugsanlegt að lægra hitastig (15°C) og þar af leiðandi lengri svörunartími geti valdið þessum breytileika. Einnig getur upphaflegur fjöldi baktería haft áhrif á endurtekningarhæfni mæliaðferðanna, t.d. fékkst hærra staðalfrávik við lægri fjölda *Pseudomonas* (SPYE-CFC). Aðrir þættir, eins og magn og sýrustig ætis í sellunum, geta einnig haft áhrif á niðurstöðum. Þetta er sérstaklega mikilvægt fyrir PPDM ætið þar sem kolsýra er leyst í ætinu og veldur lækun á sýrustigi. Skipulögð og endurtakanleg vinnubrögð eru því nauðsynleg við mælingu á fjölda *P. phosphoreum*.

### 3.7. Hittni mæliaðferðanna (accuracy)

Tafla 10 sýnir frávikin sem fengust með hefðbundnum og Malthus mæliaðferðum til ákvörðunar á heildarörverufjölda og *Pseudomonas* fjölda. Svipað og undir lið 3.6 var endurtekningarhæfnin á bilinu 0,8 til 6,1% fyrir þessar 2 mismunandi Malthus aðferðir.

Frávikin sem fengust fyrir hefðbundnar aðferðir voru lág, eins og mátti búast við, sem sagt á bilinu 0,2 til 2,1%.

**Tafla 10.** Staðalfrávik á mælingum fiskssýna með hefðbundnum (LH og CFC) og Malthus (SPYE og SPYE-CFC) mæliaðferðum

Tegund mælingar / æti	Malthus- DT (klst.)	% DT- staðalfrávik	Fjöldi skv. hefðbundinni mælingu (log <sub>10</sub> fjöldi/g)	Staðalfrávik hefðbundnar aðferðarinnar (%)
TVC*/ SPYE (Loft-fiskur, lægri fjöldi)	35,1	4,2	4,05	1,0
TVC / SPYE (Loft-fiskur, hærri fjöldi)	6,8	0,8	8,59	0,2
<i>Pseudomonas</i> fjöldi / SPYE-CFC (Loft-fiskur, lægri fjöldi)	59,7	1,8	3,26	0,5
<i>Pseudomonas</i> fjöldi / SPYE-CFC (Loft-fiskur, hærri fjöldi)	39,8	0,3	8,36	0,5
TVC / SPYE (MAP-fiskur, lægri fjöldi)	34,0	2,4	3,62	2,1
TVC / SPYE (MAP-fiskur, hærri fjöldi)	17,8	6,1	6,96	1,0
<i>Pseudomonas</i> fjöldi / SPYE-CFC (MAP-fiskur, lægri fjöldi)	63,0	2,0	2,76	1,5
<i>Pseudomonas</i> fjöldi / SPYE-CFC (MAP-fiskur, hærri fjöldi)	42,6	5,0	4,67	0,4

\* TVC : heildarörverufjöldi

Tafla 11 sýnir útreiknaðan (áætlaðan) fjölda samkvæmt Malthus mælingum í samanburði við hefðbundnar mælingar. Frávik Malthus aðferðanna eru gefin sem jákvæð eða neikvæð gildi (log/ g) eftir því hvort áætlaði fjöldinn var hærri eða lægri en raunverulegur fjöldi. Fyrir heildartalningaraðferðina (SPYE) voru frávikin hærri snemma á geymslutímanum. Þetta þýðir að áætlaður fjöldi var hærri og þetta gæti stafað af samsetningu grunnörveruflórunnar og mikilvægi sumra örverutegunda sem síðan minnkar við geymslu þegar hlutfall annarra tegunda fer vaxandi. Aftur á móti voru frávikin fyrir mat á *Pseudomonas* fjöldanum frekar lítil, sem bendir til sérhæfni þess ætis (SPYE-CFC).

**Tafla 11.** Samanburður á hefðbundnum (LH og CFC) og Malthus (SPYE og SPYE-CFC) mæliaðferðum

Geymslu aðferð notuð fyrir ýsuflok	Geymslu tími (dagar)	Áætlaður heildar- fjöldi (log/ g) (SPYE)	Mældur heildar- fjöldi (log/ g) (LH)	Frávik Malthus SPYE aðferðar (log/ g)	Áætlaður <i>Pseud.</i> fjöldi (log/ g) (SPYE-CFC)	Mældur <i>Pseud.</i> fjöldi (log/ g) (CFC)	Frávik Malthus SPYE-CFC aðferðar (log/ g)
<b>Loft</b>	3	4,29	4,05	0,24	3,11	3,26	-0,15
	6	6,93	6,46	0,47	5,77	5,42	0,35
	9	8,03	7,98	0,05	6,83	7,15	-0,32
	14	8,47	8,60	-0,12	8,00	8,36	-0,36
<b>MAP</b>	3	4,28	3,62	0,66	2,96	2,76	0,20
	10	6,29	6,01	0,28	4,61	4,42	0,19
	14	7,49	7,44	0,05	4,80	4,81	-0,01
	17	6,96	6,96	0	4,57	4,67	-0,10
	20	7,13	7,13	0	4,83	4,79	0,04

#### 4. ÁLYKTANIR

Þróun hraðvirkra mæliaðferða er nauðsynleg því hún getur verið þýðingarmikil fyrir fiskframleiðendur sem þurfa að meta gæði hráefnisins. Þekking á skemmdarferli fersks fisks og samsetningu skemmdarflórunnar er grunnur fyrir frekari þróun hraðvirkra aðferða. Uppsetning og prófun Malthus leiðniaðferða til talningar á heildarörverufjölda auk fjölda *Pseudomonas* tegunda og *P. phosphoreum* hefur verið gerð eins og kynnt í þessari skýrslu. Fersk ýsa var geymd til ákveðins tíma, bæði í lofti og loftskiptum umbúðum, og hefðbundnar sem hraðvirkar mælingar framkvæmdar á meðan geymslan stóð til þess að safna gögnum til staðalkúrfugerðar. Svörun bakteríanna í SPYE ætinu var mismunandi eftir ættkvíslum/tegundum, sem getur leitt til mikilla frávik á heildarörverufjölda í fiskafurðum með mismunandi örverusamsetningu. Þess vegna er talið nauðsynlegt að endurmeta staðalkúrfuna sem er gefin upp í skýrslunni fyrir hverja fiskafurð fyrir sig. Martinsdóttir o.fl. (2002) báru saman hefðbundnar og hraðvirkar mælingar í ferskum þorsflökum geymdum í lofti og loftskiptum umbúðum og komumst af því að staðalkúrfan hentaði vel fiskinum geymdum í lofti á meðan lægri heildarfjöldi

fékkst fyrir MAP-fiskinn seint á geymslutímanum með hraðvirkari aðferðinni. Þegar frosin þorskflök höfðu verið þídd og geymd við kæligeymslu fékkst miklu lægri heildartalningar með Malthus aðferðinni og því hentuðu ekki staðalkúrfurnar þróaðar fyrir ferskan fisk.

Samanburður á hefðbundinni talningaraðferð á *Pseudomonas* tegundum og notkun SPYE-CFC ætisins (Malthus), sem er mjög sérhæft, hefur leitt í ljós hversu áreiðanleg sú Malthus aðferðin er. Sérhæfðar talningar á *P. phosphoreum* eru mögulegar með Malthus-PPDM ætið, en stöðluð aðferð er talin nauðsynleg til að ná fram sem mestu endurtekningargæfni. En ekki er hægt að treysta algjörlega á einangrun og talningu *P. phosphoreum* með Malthus-PPDM aðferðinni vegna þess að sumar bakteríur virðast geta truflað aflestrinum og leitt til falskra jákvæðra niðurstaðna. Þetta getur gerst í öðrum fiskafurðum þar sem *P. phosphoreum* er ekki til staðar (eða í lágmarki) og grunnflóran nær að vaxa hægt. Þetta hefur til dæmis komið fram við rannsóknir á þíddum þorskflökum. Þess vegna er mikilvægt að skoða vel lögum svörunarkúrfunnar í Malthus tækinu, því *P. phosphoreum* hefur mjög týpíska svörun. Einnig er nauðsynlegt að staðfesta viðveru *P. phosphoreum* úr jákvæðri PPDM sellu eftir ræktun/svörun við upphaf hverrar tilraunar. Miklar framfarir hafa náðst með uppsetningu þessarar Malthus-PPDM aðferðar til talningar á *P. phosphoreum* í fiski. Það er nauðsynlegt að geta notað slíka tækni hér á landi til þess að meta mikilvægi þessarar bakteríu í íslenskum fiski.

## 5. HEIMILDIR

Banks J.G., L.M. Rossiter & A.E. Clark (1989). Selective detection of *Pseudomonas* in foods by a conductance technique. Í: Rapid Methods and Automation in Microbiology and Immunology, eds. A. Balows, R., C. Titon & A. Turano, bls. 725-727. Brescia: Brixia Academic Press.

Capell C.J., R.M. Kirby & M.O. Moss (1995). A method and medium for electrical detection of *Listeria* spp. from food. *Int. J. Food Microbiol.* 25, 169-178.

Dalgaard P. (1995). Qualitative and quantitative characterization of spoilage bacteria from packed fish. *Int. J. Food Microbiol.* 26, 319-333.

Dalgaard P., O. Mejlholm & H.H. Huss (1996). Conductance method for quantitative determination of *Photobacterium phosphoreum* in fish products. *J. Appl. Bacteriol.* 81, 57-64.

- Dupont J., D. Ménard, C. Hervé & B. Minier (1994). Analytical procedure for use of conductance measurement to estimate *Escherichia coli* in shellfish. *J. Appl. Bact.* 77, 296-302.
- Einarsson H., H.L. Lauzon & S. Guðmundsdóttir (1996). Predictive modelling of shelf life of fish and meat products. IFL final report for AIR 2 CT93-1251, 26 pages.
- Gram L., G. Trolle & H.H. Huss (1987). Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *Int. J. Food Microbiol.* 4, 65-72.
- Gram L. og Huss, H.H. (1996). Microbiological spoilage of fish and fish products. *Int. J. F. Microbiol.* 33 (1), 121-137.
- Gatti M. & E. Neviani (1993). A new simple medium for the detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* by measurement of conductance changes. *Lett. Appl. Microbiol.* 17, 72-74.
- Gibson D.M. & I.D. Odgen (1987). Estimating the shelf life of packed fish. Í: Seafood Quality Determination. Proceedings of an International Symposium coordinated by the University of Alaska Sea Grant Program, eds. D.E. Kramer & J. Liston, bls. 437-451. Amsterdam: Elsevier Science Publishers.
- Gibson D.M., I.D. Odgen & G. Hobbs (1984). Estimation of the bacteriological quality of fish by automated conductance measurements. *Int. J. Food Microbiol.* 1, 127-134.
- Jørgensen B.R., D.M. Gibson & H.H. Huss (1988). Microbiological quality and shelf life prediction of chilled fish. *Int. J. Food Microbiol.* 6, 295-307.
- Klausen N.K. & H.H. Huss (1987). A rapid method for detection of histamine-producing bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 5, 137-146.
- Emilía Martinsdóttir, Hélène L. Lauzon, Hannes Magnússon. 2002. Þídd sjófryst MAP-flök með skipum á erlendan markað. Rannsóknastofnun fiskiðnaðarins, verkefnaskýrsla 4-02, 28 s, lokuð
- Petitt S.B. (1989). A conductance screen for *Enterobacteriaceae* in foods. Í: Rapid Microbiology Methods for Foods, Beverages and Pharmaceuticals, eds. C.J. Stannard, S.B. Petitt & F.A. Skinner, bls. 131-141. Oxford: Blackwell Science.
- Pless P., K. Futschik & E. Schopf (1994). Rapid detection of salmonellae by means of a new impedance-splitting method. *J. Food Prot.* 57, 369-375.
- Richards J.C.S., A.C. Jason, G. Hobbs, D.M. Gibson & R.H. Christie (1978). Electronic measurements of bacterial growth. *J. Phys. E. Sci. Instrum.* 11, 560-568.
- Van Spreckens K.J.A (1974). The suitability of Long & Hammer's medium for the enumeration of more fastidious bacteria from fresh fishery products. *Archiv fur Lebensmittelsh.* 25 (10), 213-219.

## VIÐAUKI A: GREININGARPROF NOTUÐ TIL AKVÖRÐUNAR A BAKTERIU *PHOTOBACTERIUM PHOSPHOREUM*

*Photobacterium* og *Vibrio* spp.: G-, gerjandi (Marine OF test), næm fyrir 0/129 vibriostatic efni, (oxidase - eða +)

### 1. Notkun D-mannitol (0,2%) eða $\beta$ -hydroxybutyrate (0,1%)

*Photobacterium* (-, -) vs. *Vibrio* (+,+)

Notað eru sterflir sérstakir bakkar (microtiter plates). 200  $\mu$ l "minimal medium" (BS+GA lausnir dauðhreinsaðar sér) með viðkomandi efnið (D-mannitol (0,2%) eða  $\beta$ -hydroxybutyrate (0,1%)) er pípettað í holurnar. Tveggja daga rækt (15°C í super marine æti) er þynnt (log 8-9 niður í log 4-5) og 20  $\mu$ l (log3-4) sett út í 200  $\mu$ l ætið (geyma bakkann á ís á meðan sáningin stendur). Kontrol holur eru með 20  $\mu$ l MRD í stað þess að hafa rækt. Rækta við 15°C í 2 vikur (í plastpoka). Lesa af (590 nm) vikulega í Multiskan tæki. PP-100 (DK) er notað til viðmiðunar. Svar um 0,5 ABS gildi > en PP gildi er (+) svar, annars (-).

Efnið: 1 ml  $\beta$ -hydroxybutyrate steríl lausn (1g/ 5ml) í 20 ml BS-GA lausn (0,1%)

1 ml D-mannitol steríl lausn (2g/ 5ml) í 20 ml BS-GA lausn (0,2%)

**Minimal medium (MM)** (Ringø et al. 1984; Myers and Nealson, 1988)

BS (Basic substrate): 500 ml deionised water

NaCl	: 10.00 g	NaHCO <sub>3</sub> (A2454)	: 0.168 g
MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O (A1901)	: 7.20 g	CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O (A1459)	: 1.00 g
KCl	: 1.00 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (A1055)	: 1.189 g
Tris-HCL (Sigma T-3253)	: 8.00 g		
Stock solution A	: 1.00 ml		
Mineral salt solution	: 1.00 ml		

pH stillt á 7,5

Stock solution A: leyst í 10 ml; 1 ml sett út í 500 ml BS

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> : 0.2 g                      H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> : 0.035 g                      Titriplex (Na<sub>2</sub>-EDTA): 0.25g

GA (gerextrakt og amínósýrur): 500 ml deionised water

L-glutamate (Sigma G-1251):	0.020	g (D2010)
DL-aspartic acid (Sigma A-4409):	0.020	g
L-arginine,HCL (Merck 1543):	0.020	g (D2003)
DL-serine (Sigma S-4500):	0.040	g (D2026)
Yeast extract:	0.20	g

Mineral salt lausn (\*\*):

NiCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	: 1.20 g/l	CoCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	: 0.25 g/l
FeCl <sub>3</sub> 6 H <sub>2</sub> O (A1751)	: 0.50 g/l	CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O (A1602)	: 0.25 g/l
ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O (A2905)	: 0.50 g/l	H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	: 0.17 g/l
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O (A1951)	: 0.38 g/l		
Deionised water	1000 ml		
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> notað (nokkrir dropar) til að leysa betur			

**Heimildir:** Myers, C.R. and Neelson, K.H. (1988) Bacterial manganese resuction and growth with manganese oxide as the sole electron acceptor. *Science*, **240**, 1319-1321.

Ringø, E., Stenberg, E. and Strøm, A. R. (1984) Amino acid and lactate catabolism in trimethyl oxide respiration of *Alteromonas putrefaciens* NCMB 1735. *Applied and Environmental Microbiology*, **47**, 1084-1089.

**2. Til að greina milli *P. phosphoreum* og *P. leiognathi* eða *P. angustum***

**a. Notkun pyruvate (0,2%) eða acetate (0,2%): Pp (-,-); hin (+,+)**

1 ml pyruvate steríl lausn (2g/ 5ml) í 20 ml BS-GA lausn (0,2%)

1 ml acetate steríl lausn (2g/ 5ml) í 20 ml BS-GA lausn (0,2%)

Notkun bakka og sáning eins og lýst fyrir ofan.

**b. Gas myndun frá D-glúkósa: Pp (+); hin (-)**

*Heimild: Bergey's, bls. 542*

**Basal medium + YE+D-glúkósi + agar (í einum lítra)**

6.1 g Tris-HCl (pH 7.5)	1.0 g NH <sub>4</sub> Cl
0.075 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O	0.028 g FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O
5.0 g yeast extract	2.0 g agar
10.0 g D-glúkósi	

1/2 ASW eða [ 11.7 g NaCl + 12.3 gMgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.75 g KCl + 1.45 g CaCl<sub>2</sub>\*2H<sub>2</sub>O ]

[ N.B.: salts dissolved separately, then combined ]

Hitað vel til að leysa agarinn, dælt í 10-ml portion, dauðhreinsað (121°C, 15 mín), kælt, ætið stungið með rækt (stab inoculated). Glösin kæld (30 mín) áður en "agar plug" eru hellt í þeim.

Agar plug: 5 ml 2% (w/v) agar (41°C)

Ræktað við 15°C í 7 daga. Vöxtur (turbidity) + gasmyndun = + svar

**SUPERMARINE BROTH**

Marine broth supplemented (per litre) with:

✓ 10 g Lab-Lemco; 5 g Bacto-peptone; 2 g yeast extract.