

Vekststudie av
Pasteurella sp. isolert fra
oppdrettet rognkjeks,
Cyclopterus lumpus

Anne Vesterdal Tjessem



Master i fiskehelse

UNIVERSITETET I BERGEN

1. juni 2016

Forord

Denne masteroppgaven er en del av profesjonsstudiet i fiskehelse hos Universitet i Bergen (UiB) ved Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet. Laboratoriearbeidet har blitt gjennomført hos Vaxxinova Norway, som også har finansiert arbeidet.

Målet med oppgaven har vært å utvikle et medium for fremstilling av *Pasteurella* sp. (isolert fra rognkjeks), som tilfredsstiller kravene innen vaksineproduksjon.

Jeg vil rette en stor takk til mine veiledere, ved henholdsvis Vaxxinova og UiB, Øyvind Brune Vågnes og Duncan Colquhoun. Tusen takk for at døren din alltid har stått åpen Øyvind, slik at jeg har kunnet gledet meg over din rådgivning og ikke minst sangstemme. Jeg har satt stor pris på dine hjelpsomme råd når det gjelder oppgaven samt mindre hjelpsomme råd når det gjelder livsvalg.

Duncan, tusen takk for din tilgjengelighet og gode rådgivning, selv om du hovedsakelig har vært i Oslo har du mailmessig aldri vært langt unna.

En stor takk må også rettes til Cecilie Lie ved Vaxxinova for moderlig tålmodighet på laben, samt til alle på Vaxxinova generelt. Et bedre arbeidsmiljø skal en lete lenge etter!

Tusen takk til Agnete Fægri på Norsk Veterinærinstitutt for tips og triks innen produksjon av dyrkingsmedier.

Min medsamsvorne masterstudine, Victoria Alice Fløgum må også nevnes. Tusen takk for felles skriveborddeling, sammen har vi løst mange verdensproblemer.

Tusen millioner takk til min fine familie som jeg vet alltid er der for meg, livet mitt hadde bokstavelig talt ikke vært det det er uten dere. Sist, men ikke minst, en stor takk til min adoptivfamilie i Bergen, nemlig mine klassekamerater. Fem år med dere har vært en lek!

Bergen, juni 2016

Anne Vesterdal Tjessem

Sammendrag

Oppdrett av rognkjeks, *Cyclopterus lumpus*, er en raskt voksende sektor innen akvakultur i Norge. Bruksområdet for kultivert rognkjeks er begrenset til biologisk bekjemping av lakselus ved oppdrett av salmonider.

Rognkjeks er mottakelig for flere ulike patogener. En av de viktigste bakterielle sykdommene er pasteurellose forårsaket av en ennå ikke navngitt *Pasteurella* sp.

I 2015 var det 18 utbrudd fordelt på 14 lokaliteter. Genetiske analyser tyder på at *Pasteurella* sp. fra rognkjeks er nært beslektet med *Pasteurella* isolater isolert fra norsk atlantisk laks (*Salmo salar*) med sykdommen varracalbmi, og *Pasteurella skyensis* isolert fra skotsk atlantisk laks.

Et av de viktigste profylaktiske tiltakene mot sykdom innen akvakultur er utvikling av vaksiner. Rognkjeks utvikler en spesifikk immunrespons ved immunisering, noe som tyder på at rognkjeksens immunforsvar kan stimuleres gjennom vaksiner. Rognkjeks produsert i dag, vaksineres vanligvis mot atypisk *Aeromonas salmonicida* og *Vibrio anguillarum*.

Målet med oppgaven har vært å utvikle et medium egnet for fremstilling av *Pasteurella* sp. (isolert fra rognkjeks) til vaksineproduksjon. Tidligere arbeid på området har vist at *Pasteurella* sp. har krevd en salinitet på 1,5-2% NaCl samt blod i mediet for å vokse. For å kunne bruke et medium til vaksineproduksjon må innholdet ikke utgjøre en fare for overføring av prioner som kan forårsake overførbar spongiform encefalopati (*Transmissible Spongiform Encephalopathies*). Arbeidet har derfor vært konsentrert om en kartlegging av *Pasteurella* sp. sine næringskrav og vekstbetingelser, hvor komponentene i mediet er tilpasset vaksineproduksjon.

Seks ulike isolater ble undersøkt i oppgaven, to av isolatene var isolert fra rognkjeks og fire var isolert fra atlantisk laks. Alle isolatene ble dyrket på medier tilsatt blod, plasma eller røde blodceller. Salinitetskrav, samt hvordan CO₂ anriket atmosfære påvirket veksten, ble også testet. Evne til å vokse på de ulike mediene og under ulike atmosfærer ble sammenlignet ved å måle kolonidiameteren til bakteriene.

Et av rognkjeksisolatene fikk kartlagt næringskravene sine videre, ved å bli dyrket på flere medier med ulike tilsetningsstoffer. Isolatet viste normalt behov for salinitet på 1,5-2% NaCl. Ved tilsetning av hemoglobin i mediet vokste bakteriene like godt som på medier som inneholdt blod. Det ble også observert endringer i vekstbetingelser ved dyrking på ulike medier, samt noe forskjell mellom rognkjeksisolatene. Dette bør undersøkes nærmere for å se om det kan ha noe å si i vaksinesammenheng.

Oppgaven viser at *Pasteurella* sp. har et behov for jern i en organisk form og at den kan dyrkes uten å tilsette blod i mediet. Videre arbeid kreves for å finne komponenter som kan benyttes for å tilfredsstille dette kravet i en kommersiell produksjon.

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag	II
Forkortelser	1
Figurliste	2
Liste over tabeller.....	3
1. Innledning.....	5
1.1 Cyclopteridae	5
1.2 Rognkjeks	5
1.3 Problematikk knyttet til lakselus (<i>Lepophtheirus salmonis</i>) innen oppdrett av laksefisk	7
1.4 Bruk av rensefisk i akvakultur.....	9
1.5 Sykdommer hos rognkjeks i fangenskap	10
1.6 Familien Pasteurellaceae.....	12
1.7 Pasteurellose hos rognkjeks og laks	12
1.8 Smittefare mellom oppdrettslaks og rognkjeks	14
1.9 Vaksinerings av fisk.....	16
1.10 Immunsystemet hos teleoster	19
1.11 Dyrkingsmedium for vaksineproduksjon.....	21
1.12 Mål for oppgaven	22
2. Material og metoder.....	22
2.1 Bakterieisolater	23
2.2 Microbank™	23
2.3 Dyrkningsmedier	24
2.3.1 Preparering av medier.....	24
2.3.2 Basalmedier.....	24
2.3.3 Krav til NaCl.....	25
2.3.4 Krav til blodkomponenter.....	25
2.3.5 Andre tilsetningsstoffer	26
2.4 Inokulering av medier.....	29
2.5 GENbox.....	30

2.6 Vekstforsøk.....	31
2.6.1 Faste medier.....	31
2.6.2 Flytende medier.....	32
2.7 Statistikk.....	32
2.8 Oxoid™ X, V og XV-faktor test	33
2.9 Hel celle protein Sodiumdodecyl Polyacrylamid gelelektroforese	34
3. Resultater	36
3.1 Dyrkningsmedier og kolonistørrelse.....	36
3.1.1 Isolat RK-9100	38
3.1.2 Isolat AL-2257.....	41
3.1.3 Isolat PS-9389.....	44
3.1.4 Isolat AL-9523.....	46
3.1.5 Isolat AL-4081.....	49
3.1.6 Isolat RK-9758	51
3.1.7 Oppsummering av vekstforsøk på fast medium.....	54
3.2 Flytende medier	55
3.3 Oxoid™ X, V og XV-faktor test	59
3.4 SDS-PAGE.....	61
4. Diskusjon	66
4.1 Diskusjon av resultater	66
4.2 Diskusjon av metode	72
4.3 Muligheter for vaksinemedium	74
5. Konklusjon	75
6. Litteraturliste.....	76
7. Appendix I: Grovdata av vekstmålinger på fast medium	82
8. Appendix II: Molekylærvækt SDS-PAGE.....	103

Forkortelser

AGD: Amøbisk gjellesykdom

BA: Blod agar base tilsatt 5% storfeblod

BAB: Blod agar base

BHIB: Brain Heart Infusion Broth

CHAB: Cystein Heart Agar Blood

CFU: Koloniformende enheter (*Colony forming unit*)

DPI: Dager post inokulering

IPNV: Infeksiøs pankreas nekrose virus

NAD: Nikotinamid adenin dinukleotid

OD: Optisk densitet

PAMP: Patogen assosierte molekylære mønstre (*Pathogen associated molecular patterns*)

RBC: Røde blodceller

RPM: Runder per minutt

SB: Standard buffer

SDS-PAGE: Hel celle protein Sodiumdodecyl Polyacrylamid Gelelektroforese

TMTC: Teppevekst (*Too many to count*)

TSA: Tryptic Soy Agar

TSB: Tryptone Soya Broth

TSE: Overførbar spongiform encefalopati (*Transmissible Spongiform Encephalopathies*)

VI: Veterinærinstituttet

VHSV: Viral hemoragisk septikemivirus

Figurliste

Figur 1: Illustrasjon av rognkjeks (hunn)

Figur 2: Diagram over bruken av antibiotika sammenlignet med produksjonen av oppdrettsfisk i norsk havbruksnæring i perioden 1981-2014

Figur 3: Diamettermåling av kolonier fra isolat 9100 på BA

Figur 4: Boksplokk som illustrerer kolonidiamettermålinger av isolat 9100

Figur 5: Boksplokk som illustrerer kolonidiamettermålinger av isolat 2257

Figur 6: Boksplokk som illustrerer kolonidiamettermålinger av isolat 9389

Figur 7: Boksplokk som illustrerer kolonidiamettermålinger av isolat 9523

Figur 8: Boksplokk som illustrerer kolonidiamettermålinger av isolat 4081

Figur 9: Boksplokk som illustrerer kolonidiamettermålinger av isolat 9758

Figur 10: Vekstkurven til mediene: TC 100 med ulike saliniteter, BHIB og TSB

Figur 11: Vekstkurver for mediene: TSB m/ 2mM jern(klorid) hexahydrat og TSB 1, 2mM jern(klorid) hexahydrat og 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment

Figur 12: SDS-PAGE isolat 9100

Figur 13: SDS-PAGE isolat 9100

Figur 14: SDS-PAGE isolat 9100

Figur 15: SDS-PAGE isolat 9100

Figur 16: SDS-PAGE alle isolater

Liste over tabeller

Tabell 2.1: Informasjon om de ulike bakterieisolatene som har vært brukt i oppgaven

Tabell 2.2: Oppsummering av medier med tilsetningsstoffer

Tabell 2.3: Oppsummering av definerte fortyndinger og inkubasjonstid for de ulike isolatene

Tabell 2.4: Dato for gjennomføring samt dyrkingsforhold for de ulike isolatene før gjennomføring av SDS-PAGE

Tabell 3.1.1: Resultater fra dyrking på ulike faste medier

Tabell 3.1.2: Måling av kolonidiameter RK-9100

Tabell 3.1.3: Måling av kolonidiameter RK-9100

Tabell 3.1.4: Måling av kolonidiameter AL-2257

Tabell 3.1.5: Måling av kolonidiameter AL-2257

Tabell 3.1.6: Måling av kolonidiameter PS-9389

Tabell 3.1.7: Måling av kolonidiameter PS-9389

Tabell 3.1.8: Måling av kolonidiameter AL-9523

Tabell 3.1.9: Måling av kolonidiameter AL-9523

Tabell 3.1.10: Måling av kolonidiameter AL-4081

Tabell 3.1.11: Måling av kolonidiameter AL-4081

Tabell 3.1.12: Måling av kolonidiameter RK-9758

Tabell 3.1.13: Måling av kolonidiameter RK-9758

Tabell 3.2.1: Vekst av RK-9100 dyrket i mediet TSB tilsatt 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment og 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053

Tabell 3.2.2: Fortynningsrekke av RK-9100, dyrket i TSB tilsatt 2 mM jern(III)klorid hexahydrat og TSB tilsatt 2 mM jern(III)klorid hexahydrat og 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment.

Tabell 3.3.1: Resultat for gjennomføring av Oxoid™ X, V og XV-faktor test.

Tabell 3.4.1: Molekylærvekt regnet ut fra SDS-PAGE figur 16

Appendix:

Tabell A1: Grovdata for tabell 3.1.2. Kolonidiametermålinger av isolat RK-9100

Tabell A1: Grovdata for tabell 3.1.3. Kolonidiametermålinger av isolat RK-9100

Tabell A2: Grovdata for tabell 3.1.4. Kolonidiametermålinger av isolat AL-2257

Tabell A4: Grovdata for tabell 3.1.5. Kolonidiametermålinger av isolat AL-2257

Tabell A5: Grovdata for tabell 3.1.6. Kolonidiametermålinger av isolat PS-9389

Tabell A6: Grovdata for tabell 3.1.7. Kolonidiametermålinger av isolat PS-9389

Tabell A7: Grovdata for tabell 3.1.8. Kolonidiametermålinger av isolat AL-9523

Tabell A8: Grovdata for tabell 3.1.9. Kolonidiametermålinger av isolat AL-9523

Tabell A9: Grovdata for tabell 3.1.10. Kolonidiametermålinger av isolat AL-4081

Tabell A10: Grovdata for tabell 3.1.12. Kolonidiametermålinger av isolat RK-9758

Tabell A11: Grovdata for tabell 3.1.13. Kolonidiametermålinger av isolat RK-9758

Tabell A2.1: Molekylærvekten (kDa) for isolat RK-9100 ved tre ulike elektroforeser (Figur 12-14)

Tabell A2.2: Molekylærvekten (kDa) for alle isolater RK-9100 (figur 16)

1. Innledning

1.1 Cyclopteridae

Familien Cyclopteridae bestod tidligere av to ulike familier, rognkjeks- og ringbukfamilien. De er nå er slått sammen og består av ca 220 arter. (Pethon and Nyström 1998) Morfologiske kjennetegn for arter tilhørende familien Cyclopteridae er blant annet manglende svømmeblære, små gjelleåpninger samt den karakteristiske sugekoppen som stammer fra omdannede bukfinner. Kroppen er dråpeformet, mangler skjell og har vanligvis benplater (tuberkler) i huden. (Mecklenburg and Sheiko 2003) Familien finnes hovedsakelig i kaldere strøk på den nordlige halvkule. I norske farvann kan man finne følgende arter: rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*), dvergekjeks (*Cyclopteroopsis macalpini*), vortekjeks (*Eumicrotremus spinosus*), svartkjeks (*Eumicrotremus derjugini*), polarringbuk (*Liparis fabricii*), kystringbuk (*Liparis montagui*), vanlig ringbuk (*Liparis liparis*), nordlig ringbuk (*Careproctus reinhardti*), liten ringbuk (*Careproctus longipinnis*), svart ringbuk (*Paraliparis bathybi*) og kongerringbuk (*Rhodichthys regina*) (Pethon and Nyström 1998).

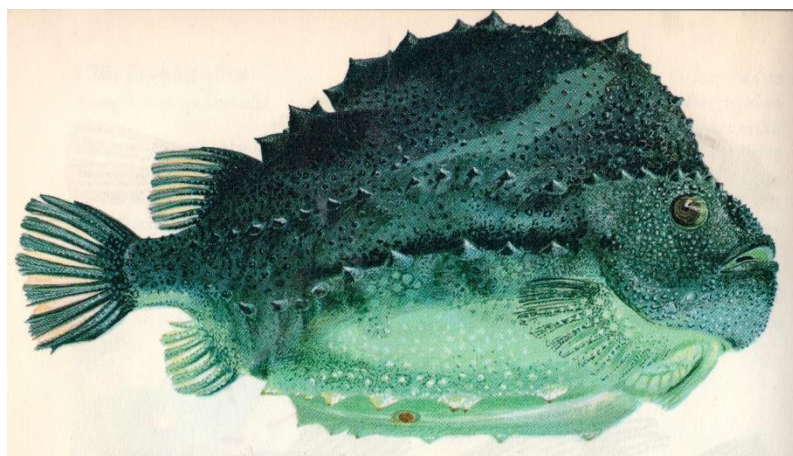
1.2 Rognkjeks

Rognkjeksens utbredelsesområde dekker begge sider av det nordlige Atlanterhavet. I vest finner man den fra New Jersey og nordover mot Hudson Bay i Canada (Cox and Anderson 1922). Mot øst finner man den ved sørkysten av Portugal (Vasconcelos et al. 2004) og nordover til Grønland samt Spitsbergen (Holst 1993) samt det nordlige Barentshavet (Sunnanå 2009). Sporadiske funn har også vært gjort i Middelhavet (Dulčić and Golani 2006).

Rognkjeksens har en kort tykk og butt kroppsform. Kroppen er uten skjell, og er dekket av syv rader med beinknuter. Som øvrige arter av familien Cyclopteridae er bukfinnene omdannet til en ventralt plassert sugeskål som rognkjeksens bruker til å feste seg med på ulike objekter (Cox and Anderson 1922).

På grunn av den manglende svømmeblæren har rognkjeksene flere ulike tilpasninger som gjør at kroppstettheten deres er svært lik tettheten til sjøvann. Blant annet er deler av skjelettet av brus samt at de dorsale musklene er store, lite kompakte, har høyt vanninnhold og lav osmolaritet. Hannene har større dorsale muskler enn hunnene, men hunnene veier opp for dette ved å ha en større andel subkutan gele konsentrert i den dorsale pukkelen. Den store kjønnsvariasjonen er relatert til tetthetsforskjellen på innholdet i ovariene og testis (Davenport and Kjørsvik 1986).

Hunnene er større enn hannene (Davenport 1985). Voksne individer kan bli opptil 63 cm og 5,5 kg. Maksimal levealder er ukjent, men den kan sannsynligvis bli eldre enn 7 år (Sunnanå 2009).



Figur 1: Illustrasjon av en rognkjeks (hunn) (Muus 1969)

Levesettet er semipelagisk. Voksne individer migrerer til kystområder i gyttiden (Cox and Anderson 1922; Goulet et al. 1986). Føden består hovedsakelig av pelagiske krepsdyr og maneter, men rognkjeksene kan også beite på bentiske organismer. Voksne individer tar ikke til seg føde under gyteperioden (Pethon and Nyström 1998).

Gytingen foregår på våren i tareskoger i hele utbredelsesområdet (Sunnanå 2009). Hunfisken inviteres til passende gyteplasser av hannene, som kalles rognkaller. Hunnene kan gyte opptil 200 000 egg i løpet av en to ukers tid (Pethon and Nyström 1998). Eggene er demersale. Ved befruktning blir eggene klebrige og samler seg til en klump som festes på hardt underlag. Hannen blir værende nær eggene for å vokte dem for predatorer samt øke oksygentilgangen ved å ventilere friskt vann inn i egg massen ved hjelp av munn og pectoralfinner (Cox and Anderson 1922; Davenport 1985).

Larver og juvenil fisk holder seg i gyteområdet, hvor den kan gjemme seg for predatorer samt hvile ved å feste seg til ulike substrat ved hjelp av sugekoppen. Sugekoppen er fullt utviklet etter fire døgn (Pethon and Nyström 1998). Etter hvert vil juvenil fisk trekke med havstrømmene til mer pelagiske farvann (Davenport 1985).

1.3 Problematikk knyttet til lakselus (*Lepophtheirus salmonis*) innen oppdrett av laksefisk

Lakselus er en marin ektoparasitt som tilhører fylum Arthropoda og infiserer fisk tilhørende genusene *Salmo*, *Salvelinus* og *Oncorhynchus* (Heuch et al. 2005; Torrissen et al. 2013).

Lakselusa har en direkte livssyklus som består av 8 stadier etter klekking; nauplius I og II (planktonisk), copepoditt (infektivt stadie), chalimus I og II (fastsittende på vert), preadult I og II (bevegelig på vert) samt adult. Lusa vil skifte skall ved overgangen til hvert stadie (Hamre et al. 2013).

Lusa lever av vertens hudceller, mukus og blod, noe som kan føre til erosjon og store skader på vertens hud. Dette kan igjen føre til anemi, sekundære infeksjoner og problemer med osmoreguleringsevnen, noe som kan resultere i økt dødelighet (Bjørn and Finstad 1998; Pike 1989). Flere studier viser at lakslusinfeksjoner øker vertens stressnivå samt fører til oppregulering av gener relatert til immunsystemet (Fast et al. 2006; Tadiso et al. 2011). Lakselusa skiller også ut farmakologisk aktive forbindelser som modulerer vertens immunforsvar slik at den ikke skal inhibere lusa (Karlsbakk et al. 2014a).

Lusa har en høy reproduktiv evne. Det er vist at en adult hunnlus kan overleve i opptil 191 dager ved 7,2°C, samt produsere over 10 par eggstrenger med 100-1000 egg i hver streng (Heuch et al. 2000). Områder med høy produksjon av laksefisk kan dermed produsere store mengder infektive lakselus-copepoditter som potensielt kan smitte både ville og oppdrettede salmonider (Jansen et al. 2012). En rekke modeller viser at smittespredningen kan være på flere kilometer. I enkelte fjordsystemer er det foreslått en teoretisk spredning av copepoditter på opptil 30 km (Asplin et al. 2011; Salama et al. 2013).

Vill atlantisk laks (*Salmo salar*) har en årlig sesongavhengig vandring som gjør at det i vinterhalvåret ikke er villaks tilgjengelig som vert for lakselus i kystområdet. Sjøørrret (*Salmo trutta*) finnes i både ferskvann og i sjø i vinterhalvåret (Thorstad et al. 2016), det vil dermed være potensielle verter for lakselus i sjøen, men i en mye lavere grad. Ved oppdrett av laksefisk får man en høy tilstedeværelse av verter også om vinteren (Heuch et al. 2002; Schram et al. 1998), noe som kan øke lusepresset ytterligere.

Det høye lusenivået som enhver tid er i sjøen vurderes som en alvorlig trussel mot de ville laksebestandene (Heuch et al. 2002; Heuch et al. 2005; Schram et al. 1998).

Høye nivåer av lakselus på oppdrettsfisk vil også gi skader som nevnt over, samt at lakselusrelaterte skader og høye nivåer av lakselus vil gi en kvalitetsmessig nedgradering av fisken (Karlsbakk et al. 2014b).

I henhold til «forskrift 5. desember 2012 nr. 1140 om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg § 8» skal det til enhver tid være færre enn 0,5 voksne hunnlus av lakselus i gjennomsnitt per fisk i akvakulturanlegget. I områder med høy tetthet av akvakulturanlegg kan dette resulterer i at anleggene må gjennomføre hyppige avlusninger.

Dette koster næringen mellom 3 til 5 milliarder hvert år (Sundnes 2016). Lusebehandlinger er også en stor belastning når det gjelder fiskens helse og velferd samt at enkelte kjemiske behandlinger medfører negative miljøpåvirkninger (Fadum 2000).

Avlusninger kan gjennomføres kjemisk eller biologisk. De siste årene har også mekanisk avlusning blitt mer utbredt.

Kjemisk avlusning kan distribueres på to måter, gjennom badbehandling (i brønnbåt eller presenning) eller oralt gjennom fôr. Ved badbehandling bruker man hydrogenperoksid eller nevrotoksiner i form av organofosfater eller pyretroider. Midlene som brukes ved oral avlusning er di-/ te-flubenzuron (kitinhemmere) eller emmamectin benzoat (nervetoksin) (Karlsbakk et al. 2014a).

Den utbredte bruken har fremavlet resistens og ført til nedsatt følsomhet mot flere av legemidlene i store deler av Norge (Stien et al. 2015) (Grøntvedt et al. 2014).

Lakselusas nedsatte følsomhet for kjemiske behandlingsmidler har ført til at man har økt behandlingsfrekvensen, behandlingsdosen og tiden fiskene oppholder seg i behandlingsmiddelet. Det blir også gjennomført behandlinger hvor man kombinerer midler som ikke nødvendigvis er godkjent i kombinasjonsbehandlinger. Dette kan føre til skader og massedød under behandling (Bornø and Linaker 2015). Spesielt gjelder dette bruken av hydrogenperoksid, da den terapeutiske indeksen er lav for fisk ved temperaturer mellom 0 – 14°C (Grant 2002).

I 2014 ble 8% av alle avlusninger gjennomført mekanisk, en metode som innebærer at fisken trenges sammen og pumpes over i et system som spylar eller børster fisken. Systemene kan også inneholde oppvarmet saltvann. Metodene skal være skånsom, men vil allikevel være en stresspåkjenning samt øke faren for mekaniske skader på fisken, som igjen kan føre til sekundærinfeksjoner (Bornø and Linaker 2015).

1.4 Bruk av rensefisk i akvakultur

Biologisk avlusning gjennomføres ved at man tilsetter rensefisk, som rognkjeks eller ulike typer leppefiskarter tilhørende familien *Labridae* i merdene. Leppefisk og rognkjeks beiter da på lakselus som den finner på laksen og det skjer en kontinuerlig avlusning på en miljøvennlig måte. Rognkjeks som brukes som lusespiser er alltid oppdrettet. En del av berggylten (*Labrus berggylta*) er oppdrettet, men hovedsakelig brukes det villfanget leppefisk av artene berggylt, grønnngylt (*Symphodus melops*), bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*) og gressgylt (*Ctenolabrus exoletus*). I 2014 ble det omsatt 21 millioner villfangede leppefisk (Stien et al. 2015).

Bruken av villfanget leppefisk er omstridt ved at man ikke kjenner den økologiske betydningen av utsett av villfisk på nye steder samt at det drives et omfattende fiske uten at bestandene er vitenskapelig kartlagt. Artene er varmekjære og har hovedsakelig en sydlig utbredelse, i Norge finner man dem nordover til Lofoten (Bakketeig et al. 2016; Stien et al. 2015).

Rognkjeks har, som nevnt, en nordligere utbredelse enn leppefisk, noe som gjør den bedre tilpasset som lusespiser ved lavere temperaturer. Den beiter hovedsakelig på de største stadiene av lakselusen og har gitt signifikant lavere lusetall på oppdrettslaksen i de forsøkene som har blitt gjort (Imstrand et al. 2014).

Rognkjeks er en relativt ny art innen akvakultur og produksjonsformålet er begrenset til biologisk bekjempelse av lakselus. I 2014 produserte 11 selskaper 3 457 000 rognkjeks, i samme periode ble det produsert 379 000 berggyllt (Fiskeridirektoratet).

I 2016 finnes det mellom 15 og 20 aktive aktører og det er estimert at disse skal produserer nærmere 20 millioner rognkjeks i løpet av året.

Rognkjeks produseres ved at vill stamfisk fanges inn og strykes. Bruk av vill stamfisk innebærer en risiko for introduksjon av smitteagens til anlegget.

Eggene inkuberes i 270-300 d°C før larvene klekkes. Etter plommesekkstadiet kan larvene fores med tørrfôr. Rognkjeks har normalt en produksjonstid på 4 til 7 måneder. Fisken leveres fra 15 gram og oppover (Lein and Jonassen 2016).

Dødeligheten blant rensfisk er svært høy og relateres ofte til håndtering, behandling av oppdrettslaksen samt sykdom (Bornø and Linaker 2015).

1.5 Sykdommer hos rognkjeks i fangenskap

Dødeligheten blant rensfisk skyldes sannsynligvis flere faktorer. I en kartlegging gjennomført av Fiskeri- og havbruksnæringens forskingsfond og Veterinærinstituttet (VI) i perioden juni til november 2013 ble det registrert 48 % dødelighet hos rognkjeks. Dødeligheten var hovedsakelig koblet til bakterielle infeksjoner, gjerne i forbindelse med utsett i sjø (Nilsen et al. 2014). Et lignende bilde så man også i 2015 da bakterielle diagnoser dominerte det innsendte rognkjeksmaterialet til VI (Bornø et al. 2016).

Få virusinfeksjoner er kjent hos rognkjeks, men Viral hemoragisk septikemivirus (VHSV) har vært påvist i villfanget rognkjeks på Island (Anonymous-VI 2015). VHSV forårsaker Viral hemoragisk septikemi som hovedsakelig er et problem på regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og ørret i ferskvann, men flere andre arter kan infiseres i både ferskvann og saltvann (Bruno et al. 2013).

VHSV deles inn i fire ulike genotyper, basert på sekvensvariasjon i genet som koder for nukleoproteinet (Snow et al. 1999). Isolatet fra rognkjeks er ikke sekvensert, men tilhører sannsynligvis genotype III som er den vanligste genotypen i marin fisk (Snow et al. 2004).

Infeksiøs pankreas nekrose virus (IPNV) er påvist på rognkjeks ved tre lokaliteter i Nordland og Nord-Trøndelag (Bornø et al. 2016).

Flere ulike parasitter er påvist på rognkjeks. Mikrosporidien *Nucleospora cyclopteri* er vist å gi sykdom hos oppdrettet rognkjeks i sjøvannsfasen (Alarcón et al. 2015a). *N. cyclopteri* er påvist flere ganger på villfisk langs norskekysten og smitter trolig direkte mellom fisk, den kan dermed blir et potensielt problem innen oppdrett (Karlsbakk et al. 2014c). *Paramoeba perurans* som forårsaker amøbisk gjellesykdom (AGD) er også påvist på rognkjeks (Bornø and Linaker 2015; Karlsbakk et al. 2014c). Nylig er det vist at rognkjeks utvikler AGD, men at sykdommen utvikler seg tregere hos rognkjeks enn hos laks (Haugland et al. 2016). Rognkjeks fungerer som vert for flere andre parasittarter, men få av disse forårsaker dødelighet (Karlsbakk et al. 2014c).

Rognkjeks er mottakelig for flere bakterieinfeksjoner. Bakteriene som hovedsakelig forårsaker sykdom er atypisk *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum*, *Pseudomonas anguilliseptica*, *Vibrio ordali*, *Moritella viscosa* og *Tenacibaculum* spp. Flere *Vibrio* arter som *V. tapetis*, *V. logei*, *V. wodanis* og *V. splendidus* har også blitt isolert, men betydningen av disse er usikker. (Bornø et al. 2016; Poppe et al. 2013) En tidligere ubeskrevet *Pasteurella* sp. har også forårsaket økt dødelighet blant oppdrettet rognkjeks. (Alarcón et al. 2015b)

54 tilfeller av atypisk *A. salmonicida* ble påvist av VI på rognkjeks i 2015. 95,12% ble gruppert innen A-lag type VI, de resterende isolatene ble typet til gruppe V (Bornø et al. 2016). A-lags typing skiller ulike stammer av *A. salmonicida* ved å sekvensere genet som koder for det virulente A-lags proteinet (Gulla et al. 2015). A-lags type VI er den som oftest påvises på leppefisk (Gulla et al. 2015), det kan derfor tyde på at den primære smittekilden er villfanget leppefisk utsatt i samme merd.

Aeromonas salmonicida subsp. *Salmonicida* (A-lags type I) har blitt påvist hos syk rognkjeks i 2015 ved et oppdrettsanlegg av laks. Smittekilden antas å være villaks, da man jevnlig har utbrudd på furunkulose på villfisk i området. Oppdrettslaksen viste ikke tegn på sykdom (Johansen et al. 2016). I løpet av 2016 har det vært påvist flere utbrudd av furunkulose på rognkjeks i samme fjord (Colquhoun, pers. med.).

Ved tilfeller av *V. anguillarum* finner man hovedsakelig serotype O1, i 2015 ble det påvist ett tilfelle av serotype O2a (Bornø et al. 2016).

1.6 Familien Pasteurellaceae

Familien *Pasteurellaceae* består av 38 beskrevne arter i tillegg til 24 sannsynligvis feilklassifiserte arter (Kuhnert and Christensen 2008). Familien består av flere genus, de fire største er *Haemophilus*, *Actinobacillus*, *Pasteurella* og *Mannheimia* (Korczak et al. 2004; Kuhnert and Christensen 2008). Bakteriene er obligate parasitter eller kommensaler på vertebrater hvor de hovedsakelig koloniserer slimhinner relatert til de øvre luftveiene og fordøyelseskanalen. De fleste taxa er potensielle patogener, men virulensmekanismene er ikke fullt ut kjent (Kuhnert and Christensen 2008).

Medlemmer av familien er Gram negative, ikke-bevegelige staver, kokker eller filamentøse bakterier med aerobe, mikroaerofile eller fakultativ anaerobisk respirasjon samt kjemo-organotrof metabolisme med mulighet for å redusere nitrat (Kuhnert and Christensen 2008).

1.7 Pasteurellose hos rognkjeks og laks

Pasteurellose hos rognkjeks forårsakes av *Pasteurella* sp. Morfologisk ser bakteriene ut som små, grå, anhemolytiske, tørre og «skyvbare» kolonier. Cellene er gram-negative, ubevegelige coccobaciller. Kolonier vises etter 48 timer inkubasjon ved 22°C på blodagar med 2% NaCl (Alarcón et al. 2015b; Poppe et al. 2013).

Kliniske tegn på pasteurellose på rognkjeks innebærer ofte synlige, ytre lesjoner på svimere og død fisk. Lesjonene er i form av hudlesjoner, blødninger på gjellene og ved finnebasis. Blødninger og hvite knuter er ofte observert i indre organer. Histopatologisk finner man bakteriell sepsis med flere mikrokolonier av korte staver i indre organer, hud og gjeller. Betennelsesgraden varierer mellom å ikke være til stede til fokal nekrose med betennesceller og granulomatøs reaksjon. Alvorlig dermatitt er ofte assosiert med mikrokolonier i huden (Alarcón et al. 2015b).

Det første registrerte utbruddet av pasteurellose på rognkjeks ble påvist i 1996 i Tromsø (Colquhoun, pers. med.).

I 2012 fikk man et utbrudd på en lokalitet i Sør-Norge (Johansen 2013). I 2013 affiserte sykdommen 16 anlegg, i 2014 fikk man en nedgang til 8 anlegg med sykdomsutbrudd (Bornø and Linaker 2015). I 2015 var det 18 utbrudd fordelt på 14 lokaliteter (Bornø et al. 2016).

Utbrudd av pasteurellose har hovedsakelig vært knyttet til sensommeren og høsten, men utbrudd har forekommet året rundt (Alarcón et al. 2015b; Bornø et al. 2016). Sykdommen har forekommet på alle stadier av rognkjeksproduksjonen, man har hatt tilfeller både på juveniler, stamfisk samt rognkjeks utsatt i merd. Dødelighet relatert til utbrudd av *Pasteurella* sp. oppstår ofte 2-4 uker etter episoder som innebærer mye stress for fisken, som vaksinerings, transport og utsett i merd. Dødeligheten kan akkumulere til høye nivåer hvis sykdommen ikke blir behandlet. Behandling med oksolinsyre har varierende effekt på bakterien, mens florfenikol er oppgitt å ha god effekt (Alarcón et al. 2015b). Sykdommen vil vanligvis returnere hvis den har funnet sted en gang (Alarcón et al. 2015b).

Nylig ble *Pasteurella* sp. påvist i melke fra rognkall (Nylund, pers. med.), dette kan tyde på at det teoretisk sett er mulig med en vertikal overføring av bakterien.

Rognkjeksisolatene produserer syre fra D-glukose, under både aerobiske og fermenterende forhold. Ved dyrking under aerobiske forhold var bakteriene svakt syredannende i laktose, mannose og galaktose, men ikke fra maltose, D-mannitol, melibiose, raffinose, rhamnose, glycerol, D-sorbitol, L-arabinose, cellobiose, i-erythritol eller dextrin. Rognkjeksisolater viser stor grad av sensitivitet ovenfor vibriostat 0/129 (Alarcón et al. 2015b).

Analyser av gensekvenser fra 16S rRNA og rpoB tyder på at *Pasteurella* sp. fra rognkjeks er nært beslektet norske *Pasteurella* isolater isolert fra atlantisk laks med sykdommen varracalbmi (samisk for «blodig øye»)(Alarcón et al. 2015b). Rognkjeksvarianten er serologisk forskjellig fra laks (Johansen et al. 2016).

Varracalbmi ble påvist sporadisk i Norge mellom 1989 til 2012 (Colquhoun, pers. med). Navnet på sykdommen beskriver noe av det mest karakteristiske med den, nemlig blodige øyne som er et resultat av hemorrhagiske og nekrotiserende lesjoner som resulterer i panoftalmitt. Sykdommen gir også gir dype sår i hud, nekrose i pseudobranken samt nekrotiserende og blødende pyogranulomatøse lesjoner i viscerale organer (Valheim et al. 2000).

De norske isolatene grupperer tett sammen med sin skotske slektning, *Pasteurella skyensis* (Alarcón et al. 2015b), som har vært assosiert med dødelighet på atlantisk laks i oppdrett i Skottland siden 1995 (Birkbeck et al. 2002).

Kliniske tegn på pasteurellose hos laks er knyttet til tap av appetitt, dødelighet samt tegn på bakteriemi og systemisk inflammasjon. Initielt finner man petikiale hemorrhager på vicera samt

hvite, fokale lesjoner på nyre, milt og hjerte. Ved kronisk utvikling av sykdommen har man sett peritonitt og falsk membrandannelse over peritoneum og svømmeblære, samt perikarditt og ascites i bukhulen (Birkbeck et al. 2002; Foyle et al. 2003; Jones and Cox 1999). Histologisk får man multifokale granulomer i nyre, lever og milt med fibrinløsr. Granulomene inneholder ofte flerkjernet kjempeceller med nekrotisk kjerne (Bruno et al. 2013).

Undersøkelse av gensekvenser fra 16S rRNA og rpoB fra ulike isolater av *Pasteurella skyensis* har vist at disse samsvarer med to ulike serotyper, kalt serotype 1 og 2 (Reid and Birkbeck 2015).

1.8 Smittefare mellom oppdrettslaks og rognkjeks

Ved innsett av rognkjeks og andre rensefisker i merd med laksefisk får man i praksis en polykultur der det er en mulighet for overføring av sykdommer mellom de ulike artene. Oppdrett av rognkjeks fører til en bedre kartlegging og kontroll av rognkjeksens sykdomssituasjon, men i og med at man fremdeles bruker villfanget stamfisk så kan man ikke se bort ifra at man kan få en vertikal overføring til avkommet. Det er foreløpig begrenset informasjon som kan belyse dette, men av det materialet man har tilgjengelig så tyder det på at rognkjeks, leppefisk og laksefisk i de fleste tilfeller har sine egne, spesifikke sykdomagens (Stien et al. 2015).

Noen agens kan imidlertid finnes i mange varianter og det antas at de kan være i stand til å endre sine egenskaper slik at de kan infisere nye vertsarter. Eksempler på dette kan være nodavirus som forårsaker viral nervenekrose på marin fisk og IPNV (Taranger et al. 2012).

Ut i fra den informasjonen som er tilgjengelig i dag vil rensefisk kunne være bærere av *Aliivibrio* spp. *V. splendidus*, *V. anguillarum*, *V. ordalii*, *Pasteurella* sp. atypisk *A. salmonicida*, *Tenacibaculum* spp. og amøben *Paramoeba perurans*. Muligheten for smitteoverføring mellom rensefisk og laks er i teorien høy grunnet den tette kontakten fisken har i merdene.

Sannsynligheten for at en smitteoverføring skal finne sted vurderes som lav, grunnet høy grad av vertsspesifisitet samt vaksinebeskyttelse hos laksen. (Taranger et al. 2012).

Oppdrettslaks er vaksinert mot *Vibrio anguillarum*, og *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* og vil derfor være beskyttet mot disse samt at vaksinen sannsynligvis til en viss grad vil gi kryssbeskyttelse mot atypisk *A. salmoicida* (Johansen et al. 2016).

Pasteurella sp. isolatene som har henholdsvis gitt sykdom på rognkjeks og laks er vist å ha et nært slektskap (Alarcón et al. 2015b), men man kjenner ikke til muligheten for kryssmitte mellom laks og rognkjeks. Gitt det betydelige smittepresset fra rognkjeks mot laks i affiserte merder indikerer at risikoen for kryss-smitte er lav.

IPNV er påvist i mange ulike fiskearter, men lite tyder på at man har en overføring av patogenet fra villfisk til tamfisk (Bruno et al. 2013). Smitteforsøk med rognkjeks tyder imidlertid på at rognkjeks kan være et reservoar for IPN og at det dermed er et mulig potensiale for smitteoverføring (Anonymous-Nofima). Etter introduksjonen av IPN QTL-rogn (Quantitative trait loci) i 2009 har IPN vært et lite problem innen oppdrett i Norge (Hjeltnes et al. 2016; Rye et al. 2010).

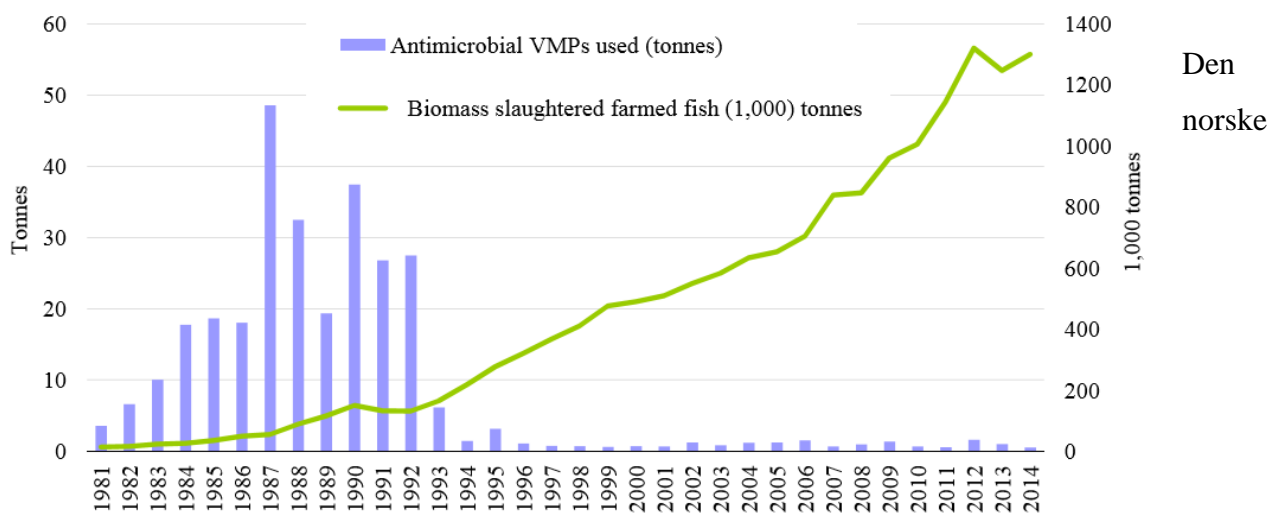
VHSV er meldepliktig i World Organisation for Animal Health (OIE) (Johansen et al. 2016) og påvisning av sykdommen vil medføre konsekvenser.

VHSV deles inn i fire ulike genotyper, basert på sekvensvariasjon i genet som koder for nukleoproteinet (Snow et al. 1999). De ulike genotypene assosieres med ulike fiskearter og geografiske områder, dog med en viss geografisk overlappning. Isolatet fra rognkjeks er ikke sekvensert, men tilhører sannsynligvis genotype III. Genotype III er isolert fra marin fisk fra områder rundt de britiske øyer i tillegg til isolater assosiert med sykdom på oppdrett av piggvar (*Psetta maxima*) (Snow et al. 2004). Genotype III har også gitt sykdom på regnbueørret i sjøvann i Norge. Senere smitteforsøk med samme isolat gav høy dødelighet på regnbueørret mens dødelighet på laks var kun observert ved intraperitoneal injeksjon av viruset (Dale et al. 2009). Samme genotype har blitt isolert og gitt sykdom hos ulike arter av leppefisk brukt som rensefisk i akvakulturanlegg av laks i Skottland (Munro et al. 2015). VHSV kan dermed representerer en trussel ved bruk av vill stamfisk og er uansett et godt argument for å lage et screeningsprogram for stamfisk.

P. perurans er påvist på rognkjeks, noe som potensielt kan øke smittepresset for laks og ørret i merd (Karlsbakk et al. 2014c). I og med at de patologiske endringene som følge av AGD utvikles saktere hos rognkjeks enn hos laks kan det føre til at rognkjeks blir asymptotiske bærere av amøben. Det er vist at rognkjeks kan fungere som vektor for spredning av *P. perurans* til laks (Haugland et al. 2016).

1.9 Vaksinerings av fisk

Ved intensivering av en biologisk produksjon vil man som regel oppleve økende sykdomsproblematikk, spesielt når det gjelder infeksjose sykdommer. Mange bakterielle problemer kan bekjempes med antibiotika, men for å oppnå en bærekraftig produksjon er det nødvendig å utvikle vaksiner. Ved vaksinerings vil man stimulere det adaptive immunsystemet med et bestemt antigen på en ufarliggjort måte, dermed vil det adaptive immunforsvaret reagere raskere neste gang det utsettes for det spesifikke antigenet, da gjerne gjennom en potensiell farlig infeksjon (Murphy 2012a).



Figur 2: Nedgangen i bruk av antibiotika sammenfaller med introduksjon av vaksiner sent på 80-tallet. (NORM-VET 2015)

oppdrettsnæringen av atlantisk laks og regnbueørret har vokst fra en produksjon på 8000 tonn i 1980 til 1 341 312 tonn i 2014 (Fiskeridirektoratet, akvakulturstatistikk, (Gudding and Reitan 2010). Samtidig ser man at bruken av antibiotika hatt en sterk nedgang siden introduksjonen av fiskevaksiner på 80-tallet, illustrert ved figur 2.

Dette skyldes flere faktorer blant annet optimalisering av driftsforhold og tiltak for å redusere smittebelastning, enkelte med grunnlag i offentlig regelverk. Forebyggende stimulering av fiskens immunforsvar i form av vaksiner ses imidlertid på som den viktigste faktoren (Gudding 2010).

I dag vaksineres norsk oppdrettslaks vanligvis mot *V. anguillarum* serotype O1 og O2a, *V. salmonicida*, *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*, IPN og *Moritella viscosa*. I enkelte områder vaksinerer man også mot PD og Infeksiøs lakseanemi (Anonymous-Ilaks 2016).

Vaksinene som benyttes i dag består stort sett av hele bakterier og virus inaktivert med formalin (Gudding et al. 1999; Gudding 2010). Ved vaksinerings mot IPN benytter man helcelle eller subenhetsvaksiner som inneholder overflateproteiner som gir immunrespons. Subenhetsvaksiner kan produseres i cellekultur eller ved at man uttrykker proteinene man vil ha i vaksinen i *Escherichia coli* bakterier, vaksinen kalles da en rekombinant vaksine (Gudding 2010).

Enkelte patogener krever bruk av adjuvans i vaksinen for å gi tilstrekkelig beskyttelse, dette gjelder spesielt for *A. salmonicida* (Gudding et al. 1999). Ved bruk av oljeadjuvans i injeksjonsvaksiner får man en depoteffekt som gir langvarig beskyttelse samt en sterkt immunrespons på innholdet av antigener i vaksinen (Midtlyng et al. 1996). Immunresponsen kan gi lokale og generelle reaksjoner, som betennelsesreaksjoner i bukhulen av varierende grad og deformasjoner av ryggraden (Gudding 2010; Hastefnl et al. 2005). Alvorlige bieffekter vil påvirke fiskens velferd negativt, samt at det kan gå utover fiskens vekst og kvaliteten til det ferdige produktet (Gudding 2010; Midtlyng and Lillehaug 1998).

Graden av bivirkninger vil også påvirkes av faktorer som vaksinasjonsvolum, fiskens størrelse og vanntemperatur (Gudding 2010).

I settefiskperioden kan man stort sett beskytte salmonider mot de fleste aktuelle smittestoffer med ulike hygieniske og driftsmessige tiltak. Dette gjør at man kan vente med å vaksinere fisken til den er av en viss størrelse for å sikre at fisken takler vaksinerings og vaksinen, samt at fisken rekker å opparbeide seg god nok immunitet før den overføres til sjøvann, hvor den vil utsettes for et større smittepress (Gudding 2010).

Ved vaksinerings av salmonider i Norge benytter man hovedsakelig intraperitoneal injeksjon, men man kan også distribuere vaksine gjennom bad eller dypp (Hastefnl et al. 2005). Fordelen ved injeksjon er at man gir fisken direkte en kjent mengde antigen, og dosen antigen man trenger er

mindre enn ved de andre distribusjonsmetodene. Man kan også kombinere ulike antigener. Metoden er den som gir best immunrespons og ved bruk av adjuvans er det mulig å oppnå immunitet gjennom hele produksjonen. Baksiden er at metoden krever mye håndtering, er arbeidskrevende og kostbar å gjennomføre. Fisken må også være av en viss størrelse, noe som kan være en utfordring ved vaksinerings av marin yngel da denne vil bli utsatt for et større smittepress på et tidligere stadium (Gudding 2010; Sommerset et al. 2014).

Ved vaksinerings av yngel, særlig marin yngel, kan det derfor være hensiktsmessig å benytte immersjonsvaksinerings gjennom dypp eller bad. Man må også her vente til fisken har utviklet evnen til å gi et spesifikt immunsvaret. Dette formen for vaksinerings gir mindre håndtering av fisken, men krever større mengder vaksiner (Plant and LaPatra 2011). Dyppvaksinerings foregår ved at fisken overføres til en tank med fortennet vaksiner (vanligvis 1:10) i et gitt tidsrom angitt av vaksinerprodusenten (vanligvis 30 sekunder). Ved badvaksinerings stopper man vanntilførselen og reduserer vannmengden i karet fisken oppholder seg i, for så å tilsette vaksinen direkte i karet. Vanligvis benytter man en fortykning på 1:500 eller 1:1000. Holdetiden er vanligvis på 30-60 minutter (Gudding 2010). Immersjonsvaksinerings kan være effektivt for flere patogener, men da enkelte patogener krever adjuvans for å gi immunrespons er det ofte mer hensiktsmessig å vaksinere ved injeksjon (Sommerset et al. 2014).

Rognkjeks vaksineres både med dypp og intraperitoneal injeksjon. Ved dyppvaksinerings vaksineres yngelen en gang ved 1 gram, deretter på ny ved 5 gram. Vaksinerings er da rettet mot lokale *Vibrio* spp. problemer. Rognkjeks kan vaksineres intraperitonealt ved 8-10 gram og en lengde på 4,5 cm fra snute til halebasis. Det vaksineres da mot atypisk *Aeromonas salmonicida* A-lag type V og VI samt *Vibrio anguillarum* serotype O1 og O2a (Vågnes, pers. med.). Fiskehelsepersonell har etterlyst bedre kartlegging av effekt og bivirkninger som følge av vaksinerings, samt at gode protokoller for vaksinerings bør utvikles for rognkjeks (Nilsen et al. 2014). Blant annet bør vaksinert fisk holdes i settefiskanlegget i 350-400 d°C for at den skal få tid til å opparbeide immunitet før den settes ut sjø. Rognkjeks har vist en stigning i antistoffmengde mot vaksiner opptil 600 d°C etter vaksinerings (Vågnes, pers. med.). Dette som viser at fisken bør vaksineres i god tid før utsett.

1.10 Immunsystemet hos teleoster

Da rognkjeks er en ny art innen oppdrett finnes det veldig lite vitenskapelig arbeid på immunsystemet dens. Dette kapittelet vil derfor hovedsakelig ta for seg en generell gjennomgang av hva man vet om vertebrater og teleosters immunsystem, samt det arbeidet som har blitt publisert på rognkjeks.

Teleoster har utviklet de fleste immunologiske mekanismer som man finner hos høyerestående vertebrater, men generelt er immunapparatet mindre differensiert enn hos pattedyr (Gudding 2010). Man deler immunsystemet inn i en uspesifikk og medfødt del, samt en spesifikk og adaptiv del. Fisk utsettes direkte for mikroorganismer fra embryonale stadier av, dette gjør at den medfødte delen av immunforsvaret gjerne er av større betydning enn den adaptive delen på tidlige stadier (Uribe et al. 2011).

Hos teleoster finner man lymfoid vev i tymus, fremre del av nyre samt milt (Zapata et al. 2006). Lymfoid vev har også blitt påvist i epitelet ved basen av gjellebuen hos atlantisk laks (Haugarvoll et al. 2008).

Det medfødte immunforsvaret er et førstelinjeforsvar, men spiller også en rolle i aktivering av det adaptive immunforsvaret (Magnadóttir 2006). Det består av tre deler; fysiske barrierer av epitel og mucus, humorale komponenter og ulike typer celler (Magnadóttir 2006).

Skjell, mucusoverflater på hud og gjeller samt epidermis fungerer som førstelinjeforsvar mot infeksjose patogener ved å fysisk hindre dem fra å trenge inn i verten (Magnadóttir 2006).

Mucuset inneholder også humorale komponenter som vil inhibere patogener fra å etablere seg i fisken (Alexander and Ingram 1992; Boshra et al. 2006; Saurabh and Sahoo 2008).

De humorale komponentene er ulike proteiner som man finner i serum og vevsvæsker (Gudding 2010). Transferrin, caeruloplasmin og metallthionein er proteiner som binder metallioner, hovedsakelig jern, for å forhindre at patogener kan bruke dem som kilde til uorganiske ioner (Alexander and Ingram 1992). Interferoner er signalproteiner som man finner både cellulært og i serum og som vil omgjøre andre celler til anti-virus celler ved aktivering (Alexander and Ingram 1992). Antibakterielle proteinaser er involvert i inhibering av ekstracellulære proteaser sekret av fiskepatogener (Alexander and Ingram 1992).

Komplementsystemet er en gruppe plasmaproteiner som kler mikrober, men ikke organismens egne celler, med komplementfragmenter. De komplementkledde mikrobene vil deretter bli

bundet til makrofager med komplementreseptorer for så å bli fagocyttert (Murphy 2012b). Aktivering av komplementsystemet vil også føre til lokale betennelsesreaksjoner samt stimulere det adaptive immunforsvaret (Boshra et al. 2006).

Leukocytter (hvite blodceller) er flere celletyper som perforerer bakterier og kappekledd virus. Både lymfocytter, monocytter/ makrofager samt polymorfnukleære celler er påvist hos rognkjeks (Haugland et al. 2012; Rønneseth et al. 2015).

Uspesifikke cytotoksiske celler er dokumentert i flere ulike fiskearter. Disse cellene tilsvarer Natural Killer celler hos pattedyr (Gudding 2010).

De fagocytterende cellene aktiveres ved at spesielle molekulære mønstre oppdages av reseptorer eller proteiner. De molekulære mønstrene kalles ofte PAMPs (fra engelsk *pathogen associated molecular patterns*). Dette er molekyler som vanligvis ikke uttrykkes i multicellulære organismer, eksempler på PAMPs kan være; lipopolysakkarider som man ofte finner i bakterielle cellevegger, viralt dobbeltrådet RNA og bakterielt DNA (Magnadóttir 2006; Murphy 2012b).

På tross av de ulike komponentene i det medfødte immunforsvaret kan patogener etablere seg i verten. Høyerestående vertebrater, inkludert teleoster, har derfor utviklet et adaptivt immunologisk system som produserer spesifikke antistoffer samt innehar en immunologisk hukommelse (Gudding 2010; Murphy 2012b). Evnen til å produserer spesifikke antistoffer samt evnen til immunologisk hukommelse varierer mellom artene (Gudding 2010).

B- og T- lymfocytter utgjør den cellulære delen av det adaptive immunforsvaret. De aktiveres når antigener eller antigenpresenterende celler tar opp antigener ved en infeksjon og fører det til sekundære lymfoide organer (Murphy 2012b).

Dette setter i gang den humorale responsen hvor spesifikke antistoffer (immunoglobuliner) produseres og vil binde seg til de spesifikke antigenene. Dette setter i gang prosesser som nøytralisering av antigenet, opsonisering som fører til fagocytose av antigenet samt komplementaktivering (Murphy 2012b). Immunoglobulinene (Ig) uttrykkes enten på overflaten av B-lymfocytter eller de skilles ut av differensierte B-celler, kalt plasmaceller. B-lymfocytter aktiveres gjennom antigener og antigenpresenterende celler, T-lymfocytter og ulike cytokiner. På grunn av immunoglobulinenes oppbygging vil de ha et stort utvalg av reseptorer med spesifisitet for ulike antigener (Murphy 2012b). Tetramerer bestående av IgM er den dominante klassen av immunoglobuliner hos teleoster, på grunn av dens struktur har den åtte antigenbindende seter

(Acton et al. 1971). Nivået av IgM i serum variere stort hos teleoster (Uribe et al. 2011). Man finner også immunoglobuliner av typen IgD og IgZ/ IgT hos teleoster (Danilova et al. 2005; Hansen et al. 2005; Wilson et al. 1997).

Ved immunisering av rognkjeks har man sett tilstedeværelse av spesifikke og/ eller kryssreaktive antistoffer to uker etter immunisering (Dawit 2015). Det indikerer at rognkjeks har en spesifikk immunrespons som kan stimuleres gjennom vaksinerings.

1.11 Dyrkingsmedium for vaksineproduksjon

Flytende dyrkingsmedier var de første dyrkingsmediene for mikroorganismer som ble tatt i bruk. De har sitt opphav i Robert Koch (1834-1910) som isolerte bakterien *Bacillus anthracis* fra kveg og viste at den, etter isolering og kultivering i flytende medium, igjen kunne gi sykdom hos kveg. Han grunnla med dette Koch's postulat som er grunnlaget for å vise at en spesifikk mikroorganisme er opphavet til en spesifikk sykdom (Brock et al. 1984).

I Koch's tilfelle brukte han serum eller aqueous humour fra storfe for å dyrke *B. anthracis*, da mange mikroorganismer trenger komponenter fra levende organismer for å kunne uttrykke antigener *in vitro* (Brock et al. 1984). Mange sykdomsrelaterte bakterier krever biologiske komponenter for å vokse, noe som skaper et problem i produksjonssammenheng, da man får en risiko for smittespredning (Gudding and Reitan 2010). I dag må peptoner, gelatin og blod fra storfe som skal inngå i humane eller veterinærmedisinske produkter testes for prioner som kan forårsake overførbare spongiforme encefalopati (TSE fra engelsk *Transmissible Spongiform Encephalopathies*) (EMA/410/01 rev.3). I OIEs Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2015, kapittel 1.1.7; «Principles of veterinary vaccine production» står det følgende; «Egenskapene og kilden til ingrediensene i (vekst-)mediet må også defineres og dokumenteres i en plan for produksjonen som må godkjennes av den ansvarlige autoriteten. Alle ingredienser av animalsk opprinnelse som ikke kan gå igjennom en validert steriliseringsprosess må bli testet for kontaminanter som bakterier, sopp, mykoplasma og virus. Disse testene må gjennomføres på en representativ mengde av hver batch/ serie (av vaksinen) før salg.»

Ved bruk av et vekstmedium uten biologiske komponenter vil man dermed eliminere mye av muligheten for kontaminering og/ eller smittespredning. Dette vil gi en enklere produksjon og en mer standardisert og reproduserbar prosess.

Flere dyrkningsbetingelser må fastsettes for å kunne dyrke en bestemt bakterieart. Dette gjelder både miljøbetingelser (pH, temperatur og sammensetning av atmosfære) samt næringssammensetning i mediet (Gudding and Reitan 2010; Singh et al. 2013). Mediet må inneholde en næringssammensetning som gir uttrykk av relevante antigener ved dyrkning av mikroorganismen. I tillegg til et grunnmedium er det derfor ofte nødvendig å tilsette aminosyrer, sporstoffer, vitaminer eller andre stoffer (Gudding and Reitan 2010).

Bakterier tilhørende genuset *Pasteurella* trenger ofte et ernæringsmessig rikt medium tilsatt blod eller serum for å kunne dyrkes, enkelte arter krever også nikotinamid adenin dinukleotid (NAD), også kalt V-faktor, for å vokse (Krieg 2007).

For de fiskepatogene artene *Pasteurella skyensis* og *Pasteurella* sp. har det så langt vært nødvendig med en tilsetning av 5% blod og 1,5-2% NaCl til agarbasen for å få vekst (Alarcón et al. 2015b; Birkbeck et al. 2002; Jones and Cox 1999). Både *Pasteurella skyensis* og *Pasteurella* sp. inkuberes vanligvis i luft på 20-22°C (Alarcón et al. 2015b; Birkbeck et al. 2002), men rognkjeksisolat av *Pasteurella* sp. har vist økt vekst ved inkubering i krukke (Alarcón et al. 2015b).

1.12 Mål for oppgaven

Målet for oppgaven har vært å undersøke *Pasteurella* sp., med vekt på isolater fra rognkjeks, sine næringskrav for å utvikle et kjemisk definert og gjerne transparent vekstmedium.

Man har også sammenlignet næringskravene til ulike *Pasteurella* sp. isolater fra laks og rognkjeks, hovedsakelig når det gjelder evne til å vokse på blod vs. blodkomponentene røde blodceller og plasma, samt evne til å vokse på ulike saliniteter.

Sent i oppgaven ble det oppdaget at isolatet RK-9758 var et rognkjeksisolat, ikke et lakseisolat slik man hadde trodd. Ved testing av potensielle vekstmedium har man derfor hovedsakelig benyttet isolat RK-9100 fra rognkjeks.

2. Material og metoder

2.1 Bakterieisolater

Alle *Pasteurella* isolater ble tilsendt på blodagar 5 % storfeblod (BA) 2% NaCl fra Veterinærinstituttet (VI) i Oslo. De ble deretter fryst ned ved hjelp av Microbank™ på -80°C.

Tabell 2.1 viser de ulike isolatene samt VI nummer som de heretter vil bli omtalt under.

Tabell 2.1: Informasjon om de ulike bakterieisolatene som har vært brukt i oppgaven.

Art:	NVI nummer:	Identifikasjon brukt her:	Isolert fra:	Område:
<i>Pasteurella</i> sp.	9100	RK-9100	Rognkjeks	Vest-Norge
<i>Pasteurella</i> sp.	2257	AL-2257	Atlantisk laks	Nord-Norge
<i>Pasteurella</i> sp.	9523	AL-9523	Atlantisk laks	Sør-Norge
<i>Pasteurella</i> sp.	4081	AL-4081	Atlantisk laks	Sør-Norge
<i>Pasteurella</i> sp.	9758	RK-9758	Rognkjeks	Vest-Norge
<i>Pasteurella skyensis</i>	9389	PS-9389	Atlantisk laks	Skottland

Etter utsåing fra Mikrobank™ til BA 2% NaCl ble bakteriene inkubert på 20°C i 5 dager før videre testing. Bakteriene ble strøket over på ny agarskål etter fem dager og ble kastet etter tredje utstrykning. Dette ble gjort for å hindre at bakteriene endret seg fenotypisk fra den opprinnelige stammen.

2.2 Microbank™

Microbank™ er et system for langtidslagring av bakterielle isolater. Det inneholder kuler og cryopreserveringsmiddel som gjør at mikroorganismer kan lagres ved lave temperaturer, i dette tilfellet ble de lagret ved -80°C.

Ved inokulering av Mikrobank™ ble prosedyren fra Pro-Lab Diagnostics fulgt.

Ved utsåing på skål fra Mikrobank™ ble det brukt steril teknikk og bakteriene ble strøket ut på BA 2% NaCl.

2.3 Dyrkningsmedier

2.3.1 Preparering av medier

Basalmediene ble preparert som oppgitt på pakningsvedlegget. Ved tilsetning av H₂O ble det brukt MilliQ deionisert H₂O.

Faste/ flytende dyrkningsmedier og tilsetningsstoffer ble autoklavert på 121°C i 15 min eller sterilfiltrert før bruk. Sterilfiltrering ble brukt på tilsetningsstoffer/ medier som ikke tålte autoklaving, henholdsvis jern(III)klorid hexahydrat, jern(II)sulfat heptahydrat, transferrin og L(+)-askorbinsyre. Ved sterilfiltrering ble det brukt Filtropur S sterilfilter med porestørrelse på 0.2 µm.

Materiale som blod fra storfe (fra VI), BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment og TC100 Insect medium var allerede pakket sterilt og det ble da benyttet sterilteknikk ved overføring til medie/ inokulering.

For å kontrollere at agarskålene var fri for kontaminering ble en skål inkubert på 37°C i 24 timer før mediet ble brukt. Prosedyren ble ikke gjennomført for alle agarskåler da tilgangen på enkelte tilsetninger var svært begrenset.

2.3.2 Basalmedier

Som basalmedie i agarform var det hovedsakelig Oxoid Blood Agar Base No. 2 (BAB) samt Tryptic Soy Agar fra VWR (TSA) som ble brukt. Begge ble testet både med og uten ulike tilsetningsstoffer. Oxoid Blood Agar Base No. 2 er en blodagarbase utviklet for næringskrevende mikroorganismer, vanligvis tilsettes den 5 % blod etter autoklaving av mediet.

TSA er et mer generelt dyrkningsmedium som gir vekst hos mange ulike mikroorganismer. Det kan suppleres med andre tilsetningsstoffer for å gi et mer spesialisert medium.

Petrisåler med *Cystein Heart Agar Blood* (CHAB) og blodagar med salinitet på 0,5% og 2% ble bestilt fra VI. CHAB er et meget næringsrikt medium utviklet for dyrking av *Francisella tularensis*. VI har modifisert mediet selv, deres versjon inneholder: BD Bacto™ Heart Infusion Broth, glukose, L-Cystein-HCl (1,48 g/L), agar, hemoglobin (0,2%) og saueblod (50 mL). Innholdet av NaCl er på 0,5%.

Flere medier i flytende form ble også testet. Oxoid Tryptone Soya Broth er et generelt medium med høyt innhold av næringsstoffer. TSB er et klart medium noe som er en fordel ved bruk av optisk densitet (OD) som mål for vekst.

Oxoid Brain Heart Infusion Broth (BHIB) er et allsidig medium utviklet for kultivering av næringskrevende mikroorganismer. BHIB er et klart medium, men har et høyt innhold av animalske komponenter.

TC100 Insect Medium ble også testet, da cellemedier generelt er rike på næring. TC100 Insect Medium inneholder flere ulike aminosyrer samt tryptose, en komponent som ofte brukes i medier for næringskrevende organismer. Mediet inneholder også D-glukose, noe rognkjeksisolatet fra *Pasteurella* sp. er vist å kunne utnytte som karbonkilde. (Alarcón et al. 2015b) TC100 er vist å gi svært god vekst av *Pscirickettsia salmonis* i kombinasjon med insektcellelinjen sf21 (Birkbeck et al. 2004). Mediet ble tilsatt 10% føtalt kalveserum før bruk, i cellekulturer er dette vanlig praksis for å fremme delingsevnen. Man bruker føtalt serum da dette skal være fritt for antistoffer som kan skade cellene samt at det er mindre sannsynlig at det inneholder virus i forhold til serum fra voksne individ.

Ulike tilsetninger ble tilsatt basalmediene for å spesialisere mediet mot visse ernæringsbehov.

2.3.3 Krav til NaCl

NaCl ble først testet på BA i konsentrasjonene 0,5%, 1%, 1,5%, 2% og 2,5%.

På de resterende mediene ble det hovedsakelig brukt en konsentrasjon på 1,5% og 2%.

2.3.4 Krav til blodkomponenter

For å få en indikasjon på hvilke fraksjoner i blodet *Pasteurella* sp. er avhengig av, ble blod fra storfe sentrifugert for å isolere røde blodceller (RBC) og plasma hver for seg.

Blodet ble sentrifugert på 1500 G ved 4°C i 10 minutter. Deretter ble plasmafraksjonen pipettert over i et eget rør. RBC fraksjonen ble tilsatt Dulbecco's Phosphate Buffered Saline til opprinnelig volum og sentrifugert på 900 G i 10 min. Dette ble gjentatt to ganger.

Plasma og RBC fraksjonen ble deretter tilsatt Oxoid Blood Agar Base No. 2.

2.3.5 Andre tilsetningsstoffer

BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment ble tilsatt TSA og TSB, alene og sammen med andre tilsetningsstoffer. Det ble tilsatt i en konsentrasjon på 1%, som foreslått i prosedyre for tilberedning chocolate agar fra BD (2015). BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment er et kjemisk definert tilsetningsstoff utviklet for næringskrevende mikroorganismer som et alternativ til blod eller gjær. Det inneholder blant annet NAD, samt ulike aminosyrer (blant annet cystein), koenzymmer, dextrose og jern(III). Det er utviklet for å øke veksten til patogene *Neisseria* arter, det har også vist seg å ha god effekt på *Haemophilus* spp. (Vastine et al. 1974)

Hemoglobin i form av Soluble Haemoglobin Powder LP0053 ble brukt for å se om RK-9100 kunne utnytte mindre bestanddeler av blodet. Hemoglobin består av en jernforbindelse som kalles hem og en proteindel (globin) (Jensen et al. 1998). En 2% stamløsning av Soluble Haemoglobin Powder LP0053 ble preparert ved å følge prosedyren for stoffet. Soluble Haemoglobin Powder LP0053 ble hovedsakelig brukt i en konsentrasjon på 1%, men ulike konsentrasjoner ble også testet. Ved tilførsel av hemoglobin ble mediet opakt og brunt til mørk brunt. Bruk av OD som et mål på vekst ble derfor vanskelig, det ble heller tatt i bruk fortynningsrekke på skål for å gi en indikasjon på vekst.

Hemin fra storfe (H9039 SIGMA) ble brukt som hemintilsetning til agar. Hemin er den oksiderte formen av hem. Hemin kalles ofte X-faktor og ble også forsøkt tilsatt ved hjelp av Oxoid™ X og XV-faktor disk. Hemin består av porfyrinring (protoporfyrin IX) med et kloratom bundet til jern(III). TSA ble tilsatt en konsentrasjon på 20 mM/ 13 mg/mL av hemin fra storfe (H9039 SIGMA).

Transferrin i form av holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA) ble tilsatt agar alene og sammen med henholdsvis jern(III)klorid og jern(II)sulfat heptahydrat. Transferrin er et jernbindende glykoprotein som man finner i plasma. Det er hovedtransportmolekylet for jerntransport til cellene og den fysiologiske riktige metoden å distribuere jern på i cellekultur.

(Huebers and Finch 1987) Ifølge Sigma Product Information for holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA) bruker man en konsentrasjon på 300 µg/L i cellekultur, denne konsentrasjonen samt dobbel konsentrasjon (600 µg/L) ble derfor tilsatt TSA. Ved tilsetning av holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA) sammen med jern(III)klorid og jern(II)sulfat heptahydrat ble det benyttet en konsentrasjon på 300 µg/L. Holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA) ble tilsatt TSA jern(III)klorid da det forhindrer reduksjon av jern(III) til jern(II) (Gomme et al. 2005; Sigma-Aldrich 2016).

En stamløsning på 5 mg/ml ble laget ved å blande holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA) med 10 ml Milli-Q H₂O som deretter ble sterilfiltrert. Løsningen ble oppbevart ved 6°C, siste bruk var etter 28 dager.

Ulike former for uorganisk jerntilsetninger ble testet i form av jern(III)klorid hexahydrat (31232 SIGMA-ALDRICH) og jern(II)sulfat heptahydrat (F8633 SIGMA). Bakterier har utviklet ulike metoder for jernopptak, hovedsakelig er det treverdige jern som tas opp ved hjelp av chelatorer som kalles sideroforer (Andrews et al. 2003). Toverdige jern kan tas opp direkte, da ved G-proteinlignende transportproteiner (Andrews et al. 2003).

Da man ikke kjenner virulensmekanismene til *Pasteurella* sp. fullt ut (Kuhnert and Christensen 2008), ble jern i begge former testet som kilde.

For begge tilsetningsstoffene ble det laget en stamløsning på 2M ved å tilsette Milli-Q H₂O, deretter ble løsningene sterilfiltrert. Det ble laget nye løsninger hver gang tilsetningsstoffene ble brukt.

L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR® ble tilsatt TSA sammen med henholdsvis jern(III)klorid hexahydrat og jern(II)sulfat heptahydrat. Askorbinsyre er et vanlig antioksiderende middel og ble brukt som et forsøk på å forhindre oksidering av jern(II)sulfat heptahydrat. L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR® ble tilsatt i konsentrasjonen 4,5 mg/ mL.

En oppsummering av ulike saliniteter og konsentrasjoner på tilsetningsstoffene er oppsummert i tabell 2.2.

Tabell 2.2: Oppsummering av medier med tilsetningsstoffer som har vært testet.

Medie:	Salinitet:	Tilsetning:
Agar:		
BA	0,9% NaCl	5 % blod (storfe)
BA	1% NaCl	5 % blod (storfe)
BA	1,5% NaCl	5 % blod (storfe)
BA	2% NaCl	5 % blod (storfe)
BA	2,5% NaCl	5 % blod (storfe)
BAB	1,5 % NaCl	5 % plasma (storfe)
BAB	1,5% NaCl	5 % RBC (storfe)
CHAB	0,5% NaCl	
TSA	0,5% NaCl	
TSA	1,5% NaCl	
TSA	2% NaCl	
TSA	1,5% NaCl	1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment
TSA	1,5% NaCl	1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053
TSA	1,5% NaCl	1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053
TSA	1,5% NaCl	0,75% Soluble Haemoglobin Powder LP0053
TSA	1,5% NaCl	0,5% Soluble Haemoglobin Powder LP0053
TSA	1,5% NaCl	0,25% Soluble Haemoglobin Powder LP0053
TSA	1,5% NaCl	2 mM jern(III)klorid hexahydrat
TSA	2% NaCl	2 mM jern(III)klorid hexahydrat
BAB	2 % NaCl	2 mM jern(III)klorid hexahydrat
TSA	1,5% NaCl	2 mM jern(III)klorid hexahydrat 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment
TSA	2% NaCl	2 mM jern(III)klorid hexahydrat 300 µg/L transferrin
TSA	2% NaCl	2 mM jern(III)klorid hexahydrat 4,5 mg/mL L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR®
TSA	2% NaCl	2 mM jern(II)sulfat heptahydrat
TSA	2% NaCl	2 mM jern(II)sulfat heptahydrat 300 µg/L transferrin
TSA	2% NaCl	2 mM jern(II)sulfat heptahydrat 4,5 mg/mL L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR®
TSA	2% NaCl	20 mM hemin fra storfe (H9039 SIGMA)
TSA	2% NaCl	300 µg/L holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA)
TSA	2% NaCl	600 µg/L holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA)

Flytende:		
TSB:	1,5% NaCl	
BHIB:	1,5% NaCl	
TC100	0,9% NaCl	10% føtalt kalveserum
TC100	1,5% NaCl	10% føtalt kalveserum
TC100	2% NaCl	10% føtalt kalveserum
TSB	0,9 % NaCl	1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053
TSB	1,5% NaCl	1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053
TSB	2% NaCl	1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053
TSB	1,5% NaCl	2 mM jern(III)klorid hexahydrat
TSB	1,5% NaCl	2 mM jern(III)klorid hexahydrat 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment

2.4 Inokulering av medier

Ved måling av kolonidiameter ble inokulering av faste medier gjennomført ved å lage en tifolds fortynningsrekke av bakteriesuspensjonen. Isolatene hadde på forhånd blitt sådd ut på BA 2% NaCl fra Mikrobank™.

Bakterier fra det aktuelle isolatet ble løst i sterilt saltvann med en salinitet tilsvarende det mediet det skulle inokuleres på. Bakteriesuspensjonen ble standardisert ved bruk av OD som måler turbiditet i løsningen. Apparatet som ble brukt var Eppendorf BioPhotometer plus, det ble brukt en bølgelengde på 600 nm. 100 µL av bakteriesuspensjonen ble pipettert ut og tilsatt 900 µL saltvann i målekyvetten for å sikre så nøyaktige OD målinger som mulig. Bakteriesuspensjonen ble deretter justert til den hadde en OD på ca. 3. Deretter ble det gjennomført en tifolds fortynningsrekke på den resterende bakteriesuspensjonen til ønsket fortykning var oppnådd. 50 µl av den valgte bakteriesuspensjonen ble deretter platet ut på mediet ved hjelp av en L-stav.

Tifoldsfortynningen av bakteriesuspensjonen som gav 50-100 cfu per skål ble brukt for kolonidiametermålinger.

Hvilken fortynning som ble platet ut samt antall dager inkubering før kolonidiameteren ble målt varierte fra isolat til isolat, da enkelte i utgangspunktet var lettere å dyrke og vokste hurtigere enn andre. Dette er oppgitt i tabell 2.3.

Tabell 2.3: Det ble brukt ulike faste definerte fortyninger og inkuberingsdøgn på de forskjellige isolatene ved kolonimåling.

Isolat:	Antall inkuberingsdøgn:	Titer bakteriesuspensjon:
PS-9389	3	10^{-6}
AL-2257	3	10^{-6}
AL-9523	5	10^{-6}
AL-4081	5	10^{-6}
RK-9758	5	10^{-6}
RK-9100	5	10^{-5}

Visuell sammenligning av bakterieskåler inkubert ved 15°C og 20°C ble sammenlignet for isolat 9100. Saktere vekst på 15°C resulterte i at 20°C ble satt som standard ved senere inkubering. Ved inokulering av flytende medie ble bakteriesuspensjon justert til $OD_{600\text{ nm}}=1$, volumet av bakteriesuspensjonen tilsvarte 1% av volumet av det flytende mediet. Risting ble satt til 180-200 rpm (runder per minutt).

2.5 GENbox

GENbox er en metode for å inkubere bakterieskåler i en modifisert atmosfære. Man bruker en lufttett krukke hvor man tilsetter standardiserte generatorer i form av poser med ulike stoffer som vil påvirke atmosfæren.

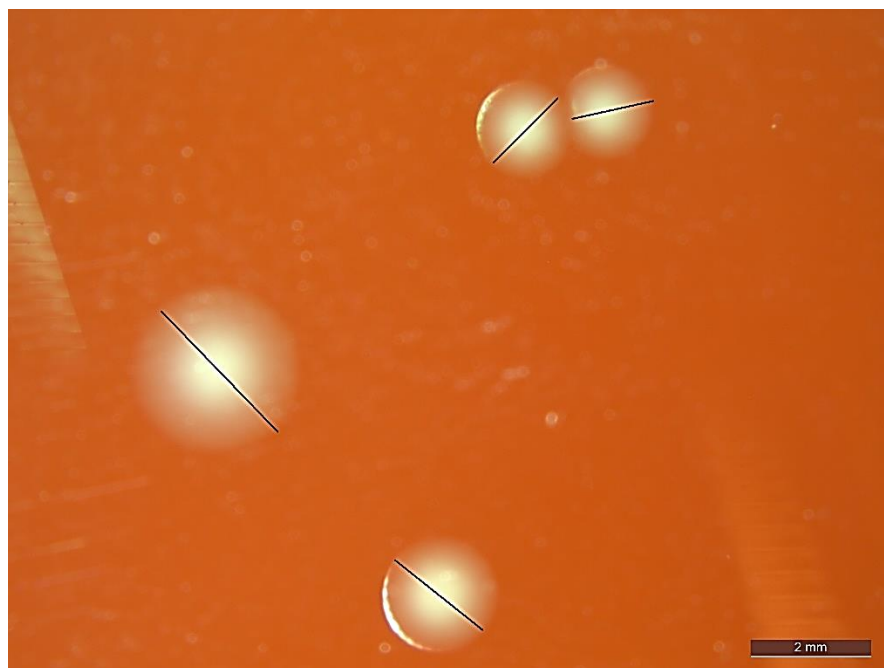
For å øke CO_2 innholdet i atmosfæren bakteriene ble inkubert i, ble det brukt poser av typen GENbox CO_2 . CO_2 innholdet i krukken vil stige til 3,5-9 % etter 24 timer. Posene inneholdt kull, natriumaskorbat samt andre organiske og uorganiske komponenter.

2.6 Vekstforsøk

Tre metoder ble brukt for å gi et mål på vekst slik at ulike medium og tilsetningsstoffer kunne sammenlignes med hverandre.

2.6.1 Faste medier

På faste medier ble kolonidiameter målt etter en fast definert fortynning som vist i tabell 2.3. For hver faktor som ble testet ble det satt opp to parallellskåler samt en positiv kontrollgruppe som også bestod av to skåler (BA med 1,5 eller 2% NaCl). Fast definert fortynning ble brukt for å få et ønskelig antall på ca 100 cfu per skål. Kolonidiameteren ble målt ved hjelp av et stereomikroskop av typen Leica M205 C og bildebehandlingsprogrammet Leica Application Suite Interactive Measurement 4.4.0. Forstørrelsen ble satt til 0.78 x. Bakteriekoloniene ble målt mot en kalibrert standard ved å tegne en linje på bildet av bakteriene som tilsvarte koloniens diameter. Ved koloniantall under 200 cfu, ble alle kolonier målt. Antall kolonier per skål ble også notert.



Figur 3: Diametermåling av kolonier fra isolat RK-9100 på BA 2% NaCl.

2.6.2 Flytende medier

Ved bruk av flytende medier som TSB, BHIB og TC100 som basale medier ble OD_{600 nm} benyttet som et mål på vekst. Etter inokulering ble OD_{600 nm} målt hver dag til ca. samme tid i en uke. Etter syv dager ble det sådd ut 50 µl fra mediet på en BA med samme salinitet som mediet for å kontrollere at det flytende mediet ikke var forurenset.

Enkelte medier var for opake til å benytte OD som målingsgrunnlag. Det ble da sådd ut en fortynningsrekke fra 10⁻³ til 10⁻⁸ fra dyrkingsmediet til BA med samme salinitet som dyrkingsmediet. Dette ble gjort fra inokulering og daglig gjennom hele forsøkets lengde. Lengden på de ulike forsøkene er spesifisert i resultatene. Denne metoden ble benyttet for alle variantene av TSB tilsatt 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053.

Ved bruk av jern(III)klorid hexahydrat i mediet ble OD_{600 nm} svært varierende, noe som gav mistanke om utfelling i mediet. Det ble derfor benyttet både fortynningsrekke og OD som mål på vekst.

2.7 Statistikk

Dataene fra målingene av kolonidiameter ble analysert av SigmaStat 3.5. Det er et statistikkprogram som hjelper brukeren å velge riktig statistikkmodell. Det ble benyttet Dunn's method for analysering av dataene. Denne testen analyserer ulike grupper opp mot en kontrollgruppe. Kun dyrkningsevne under ulike dyrkingsforhold ble analysert, isolatene ble kun sammenlignet med seg selv. Alle isolatene ble testet hvordan de vokste på ulike saliniteter, fullblod/blodfraksjoner og i luft/ CO₂ anriket atmosfære. Dyrking på fullblod i luft med salinitet 1,5% NaCl eller 2% NaCl ble satt som kontrollgruppe.

Statistisk signifikans for Dunn's Method var basert på p verdier, observasjonene ble vurdert like når $p > 0.05$ og ulike ved $p < 0.05$.

Sammenligningen mellom de ulike vekstvilkårene presenteres ved en skriftlig analyse samt boksploott. Boksplottet viser spredning i gruppen samt kvartiler. En horisontal linje gjennom boksen viser medianen. Bunnen av boksen er første kvartil, som er mindre enn eller akkurat 25% av de målte diameterne, mens toppen av boksen er tredje kvartil som viser mindre enn eller 75% av diameterne. Den vertikale øverste og nederste strekene viser lengste og minste diameter.

2.8 Oxoid™ X, V og XV-faktor test

Oxoid™ X, V og XV-faktor diskene er papirlapper impregnert med X-faktor (hemin) og V-faktor (NAD). Ved plassering av lappene på inokulerte bakterieskåler vil økt vekst i nærheten av disken tyde på at bakterien ikke er i stand til å syntetisere den aktuelle faktoren i store nok mengder selv.

Oxoid™ X, V og XV-faktor diskene er hovedsakelig brukt for å skille ulike *Haemophilus* arter, (Tebbutt 1983) men ble forsøkt brukt på *Pasturella* sp. for å se om det kunne gi en indikasjon på ernæringsmessige behov.

Oxoid™ X, V og XV-faktor testene ble gjennomført på isolat RK-9100.

Oxoid™ X, V og XV-faktor diskene ble plassert på agar-skåler ved hjelp av en engangspinsett. Deretter ble de inkubert på 20°C i 5 døgn.

Mediene som testene ble gjennomført på var:

- TSA 0,5% NaCl
- TSA 2% NaCl
- TSA 0,9% NaCl + 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment + 1% Soluble Haemoglobin Powder
- TSA 1,5% NaCl + 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment + 1% Soluble Haemoglobin Powder
- BA 0,9% NaCl
- BA 1,5% NaCl
- BA 2% NaCl
- BAB 1,5 % NaCl + 5% RBC
- BAB 1,5 % NaCl 5% plasma

Testene ble gjennomført hovedsakelig i vanlig atmosfære, enkelte av mediene ble testet med diskene i modifisert atmosfære med ekstra CO₂.

2.9 Hel celle protein Sodiumdodecyl Polyacrylamid gelelektroforese

Hel celle protein Sodiumdodecyl Polyacrylamid gelelektroforese (heretter kalt SDS-PAGE) ble gjennomført på alle isolater. For isolat RK-9100 ble det gjennomført etter at bakteriene hadde blitt dyrket under ulike dyrkingsforhold, som næringstilgang samt CO₂ anriket atmosfære, for å se om dette påvirket proteinuttrykkelsen. De resterende isolatene ble dyrket på BA 2% NaCl for å sammenligne proteinuttrykkelsen mellom dem.

Dyrkingsforholdene som ble sammenlignet er oppsummert i tabell 2.4.

Tabell 2.4: Dato for gjennomføring samt dyrkingsforhold for de ulike isolatene før gjennomføring av SDS-PAGE.

Dato:	Isolat:			
26.11.15	RK-9100	CHAB	BA 2% NaCl	BA 2% NaCl CO ₂
06.12.15	RK-9100	CHAB	BA 2% NaCl	BA 2% NaCl CO ₂
19.12.15	RK-9100	CHAB	BA 2% NaCl	BA 2% NaCl CO ₂
01.02.16	RK-9100	TSA 1,5% NaCl 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053	TSA 1,5% NaCl 1% BBL™ IsoVitaleX™Enrichment 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053	BA 1,5% NaCl
09.03.16	Alle isolater	BA 2% NaCl		

SDS-PAGE ble gjennomført etter Vaxxinovas prosedyre, beskrevet som følgende:

Bakterier tatt direkte fra skål ble løst i en steril løsning av 1,5% NaCl deionisert vann (Milli-Q) på 1 mL. Bakteriesuspensjonen ble justert til den hadde en OD_{600 nm} = 1 ved bruk av Eppendorf

BioPhotometer. Deretter ble en standard buffer (SB) mikset. SB består av β -mercaptoethanol og Bio Rad 4x Laemmli Sample buffer i et 1:10 forhold. 25 μ L av SB og 75 μ L av prøven ble deretter mikset og satt på en varmeblokk på 95°C i 5 minutter. Selve elektroforesen ble gjennomført ved å bruke en Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel 4-20% akrylamid med ti brønner. Gelen ble festet til den innerste kassetten på Mini-PROTEAN Tetra Cell og det innerste og ytterste rommet ble deretter fylt opp med running buffer. Running buffer består av 1:10 av Bio Rad TGS buffer og deionisert vann (Milli-Q). En engangs pipette ble brukt til å rense brønnene med running buffer. Deretter ble 20 μ L av bakteriesuspensjonen pipettert i brønnene. 4 μ L Precision Plus Protein™ WesternC standards ble tilsatt i en av de ytterste brønnene. Elektroforesen startet ved å sette PowerPac™ Basic Power Supply på 200 V i 35 minutter. Gelen ble deretter farget med Bio-Safe™ Coomassie i 30 min. Ved svake bånd ble gelen farget i 60 min. Deretter ble gelen lagt i en avfargingsløsning bestående av 50 % deionisert vann (Milli-Q), 40 % metanol og 10 % eddiksyre. Avfargingsløsningen ble byttet etter ca en time, deretter ble gelen liggende i samme løsning over natt.

Programmet Bio Rad ChemiDoc™ XRS+ Image System ble brukt til å ta bilder av gelene samt registrere de ulike proteinbåndene. Programmet gjorde det også mulig å regne ut proteinenes molekylærvekt.

3. Resultater

3. 1 Dyrkningsmedier og kolonistørrelse

Alle isolatene ble dyrket på BA 0,9% NaCl, BA 1,5% NaCl og BA 2% NaCl, samt blodfraksjoner i form av plasma og RBC på BAB 1,5% NaCl. Isolatene ble inkubert i luft og CO₂ anriket atmosfære på 20°C.

RK-9100 ble testet på alle medier. AL-2257 ble testet på flere medier da det skilte seg ut ved å ha mindre spesifikke næringskrav og generelt bedre vekst enn de andre isolatene. PS-9389 ble også testet på flere medier for å se hvor stor likhet det var mellom de mest genetisk ulike isolatene. Resultatene er oppsummert i tabell 3.1.1 I tabellen er vekst definert ved antallet koloniformende enheter (cfu, fra engelsk *colony forming unit*) som vokste opp. Veksten ble definert gjennom kriteriene; «ingen vekst» som tilsa at det ikke var vekst i det hele tatt. «Minimal vekst» ble definert som oppvekst av svært få kolonier i forhold til koloniantallet på kontrollgruppen (>ca. 10%). Antall kolonier identifisert på forskjellige medier varierte fra 0 cfu til ca 10% cfu av antallet på kontrollskålene, de ble da definert som ingen vekst/ minimal vekst. «Intermediær vekst» ble definert som godt synlig vekst, men merkbart mindre enn på kontrollskålene. «God vekst» ble definert som tilsvarende vekst som på kontrollskåler.

Tabell 3.1.1: Resultater fra dyrking på ulike faste medier. -: ingen vekst, +: minimal vekst, ++: intermediaær vekst, +++: god vekst, (-CO₂): merkbart dårligere ved CO₂ anriket atmosfære. Grå områder: mediet er ikke testet.

Isolater/ Medier	RK-9100	AL-2257	PS-9389	AL-9523	AL-4081	RK-9758
BA 0,9% NaCl	-	+++	++ (-CO ₂)	-	-	-
BA 1 % NaCl	-/+					
BA 1,5 % NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BA 2 % NaCl	+++	+++	+++	+++	+++	+++
BA 2,5 % NaCl	++					
BAB 1,5 % NaCl, 5% RBC	+ / ++	+++	++	+++	- / +	+++
BAB 1,5 % NaCl, 5% plasma	- / +	+++ (-CO ₂)	+	++	-	++
CHAB 0,5% NaCl	+++ (-CO ₂)					
TSA 0,5% NaCl	-					
TSA 1,5% NaCl	-					
TSA 2% NaCl	-	+++	-			
TSA 1,5% NaCl 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment	-					
TSA 1,5% NaCl 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment + 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053	+++					
TSA 1,5% NaCl 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053	+++					
TSA 1,5% NaCl 0,75% Soluble Haemoglobin Powder LP0053	+++					
TSA 1,5% NaCl 0,5% Soluble Haemoglobin Powder LP0053	++					
TSA 1,5% NaCl 0,25% Soluble Haemoglobin Powder LP0053	++					
TSA 1,5% NaCl 2 mM jern(III)klorid hexahydrat	-					
TSA 2% NaCl 2 mM jern(III)klorid hexahydrat	-	+++	-			
BAB 2% NaCl 2 mM jern(III)klorid hexahydrat	-					
TSA 1,5% NaCl 2 mM jern(III)klorid Hexahydrat 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment	-					
TSA 2% NaCl 2 mM jern(III)klorid hexahydrat 300 µg/L transferrin	-	+++	-			
TSA 2% NaCl 2 mM jern(III)klorid hexahydrat 4,5 g/L L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR®	-	-	-			
TSA 2% NaCl 2 mM jern(II)sulfat heptahydrat	-	+++	-			
TSA 2% NaCl 2 mM jern(II)sulfat heptahydrat 300 µg/L transferrin	-	+++	-			
TSA 2% NaCl 2 mM jern(II)sulfat heptahydrat 4,5 g/L L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR®	-	-	-			
TSA 2% NaCl 20 mM hemin fra storfe (H9039 SIGMA)	-					
TSA 2% NaCl 300 µg/L holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA)	-					
TSA 2% NaCl 600 µg/L holo-Transferrin fra storfe (T1283 SIGMA)	-					

Generelt så man at isolatene vokste lite til ingenting på BA 0,9% NaCl. Unntakene var AL-2257 og PS-9389. Alle isolatene vokste godt på BA 1,5% NaCl og BA 2% NaCl.

Ved tilsetning av blodfraksjoner (RBC og plasma) til BAB var resultatet svært varierende. RBC alene gav som regel bedre vekst enn plasma alene, men generelt var veksten mye bedre på fullblod enn ved tilsetning av enkelte blodfraksjoner.

3.1.1 Isolat RK-9100

Isolat RK-9100, *Pasteurella* sp. er, som oppgitt i tabell 2.1, isolert fra rognkjeks fra Vest-Norge. Dataene for RK-9100 er presentert i tabell 3.1.2 og 3.1.3 To parallellskåler ble inokulert for hver komponent som ble testet.

Tabell 3.1.2: Tabellen viser resultatene for dyrking på ulik atmosfære ved tilsetning av ulike blodfraksjoner samt salinitet. Ulik bakteriesuspensjon ble benyttet for mediene med 1,5% NaCl og 2% NaCl

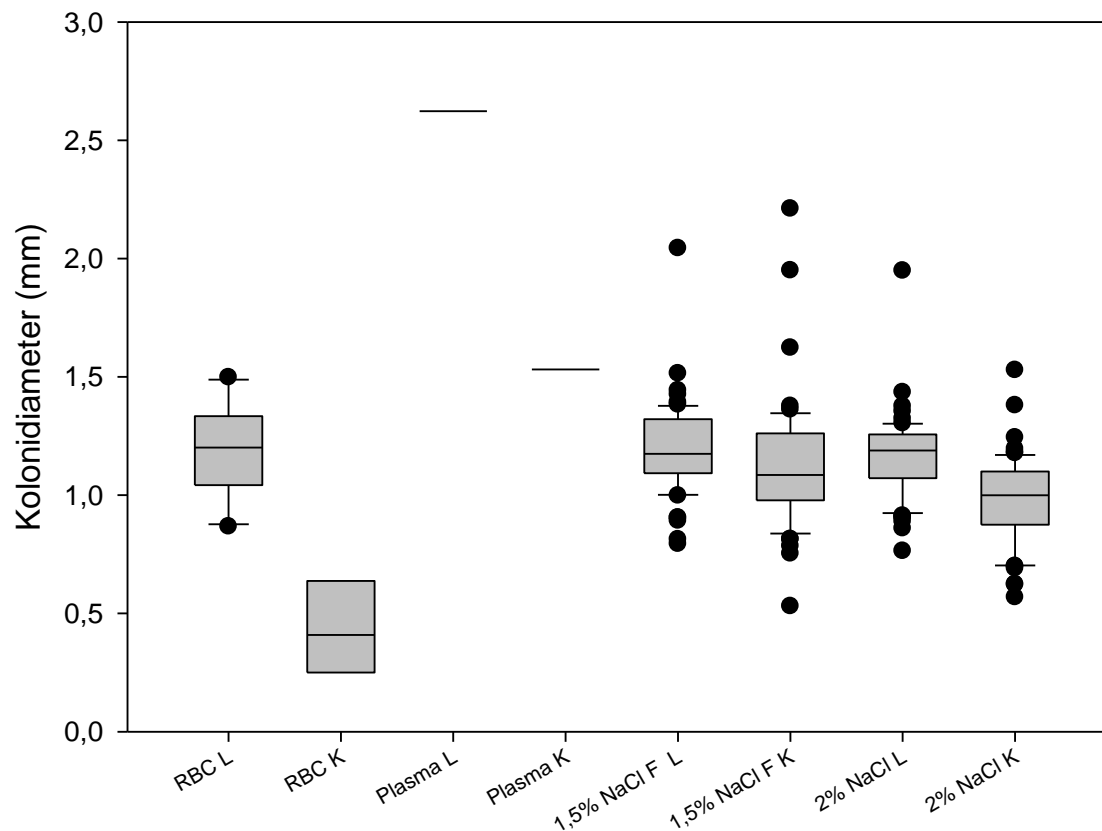
Atmosfære:	Medium:	N (antall cfu):	Median (mm):	
Luft:	BA 1,5% NaCl	31	1,121	
		37	1,287	
	BAB 1,5% NaCl 5% Plasma	2	2,623	
		0		
	BAB 1,5% NaCl 5% RBC	5	1,085	
		4	1,311	
	BA 2% NaCl	39	1,162	
		27	1,218	
	CO ₂ :	BA 1,5% NaCl	35	1,210
			22	1,022
BAB 1,5% NaCl 5% Plasma		1	1,531	
		0		
BAB 1,5% NaCl 5% RBC		3	0,613	
		3	0,252	
BA 2% NaCl		40	0,956	
		29	1,057	

Tabell 3.1.3: Tabellen viser medianen ved måling av kolonidiameter samt antall cfu ved dyrking på BA 1,5% NaCl og BA 2% NaCl samt CHAB. Det ble benyttet ulik suspensjon på alle mediene.

Atmosfære:	Medium:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft:	BA 1,5% NaCl	47	1,023
		42	0,953
	BA 2% NaCl	277	0,611
		306	0,585
	CHAB	168	0,436
		161	0,500
CO ₂ :	BA 1,5% NaCl	57	0,762
		42	0,792
	BA 2% NaCl	304	0,593
		287	0,603
	CHAB	0	
		0	

I målingene i tabell 3.1.2 samt de resterende kolonidiameter målingene fra samme test, illustrert ved boksploott. Parallellskålene er summert slik at hver boks illustrerer målingene fra begge skålene. Inkubasjon i luft er merket med «L», inkubasjon i CO₂-anrikt atmosfære er merket med «K».

RK-9100, Salinitet og blodfraksjoner



Figur 4: Figur 4 viser 1., 2. (medianen) og 3. kvartil for kolonidiameteren for isolat RK-9100 dyrket på BAB med blodfraksjoner, fullblod og ulike saliniteter. L (luft) og K (CO₂ anriket atmosfære) viser inkuberingsatmosfæren. Hver boks viser summen av begge parallellskåler, koloniantallet for hver skål er vist i tabell 3.1.2

En statistisk analyse (Dunn's method) ble gjennomført på gruppene BA 1,5% NaCl og BA 2% NaCl inkubert i luft og i CO₂ anriket atmosfære (vist i tabell 3.1.2). Ved gjennomgang av analysen er medianen til kolonidiameteren signifikant større ved inkubering i luft i 4 av 8 tilfeller, i forhold til inkubering i CO₂ anriket atmosfære. De resterende 4 tilfellene viser ingen signifikant forskjell. Kun parallelle grupper ble sammenlignet.

Sammenligning av median ved dyrking på ulike saliniteter (1,5% NaCl og 2% NaCl) gav signifikant større median ved bruk av 1,5% NaCl i 2/8 tilfeller, de resterende 6 tilfellene gav ingen signifikante forskjeller.

Resultatene i tabell 3.1.3 ble ikke statistisk analysert på grunn av stor spredning i antall cfu.

Tilsetting av blodfraksjonene plasma og RBC gav lavere cfu antall enn ved tilsetting av fullblod. Medier med lavt antall cfu kunne allikevel ha kolonier med normal kolonidiameter størrelse. Ved dyrking på CHAB får man tilsvarende vekst som på BA 1,5% NaCl og BA 2% NaCl, til tross for at CHAB hadde en salinitet på 0,5% NaCl.

Isolat RK-9100 vokste ikke på CHAB i CO₂ anriket atmosfære.

CO₂ anriket atmosfære ser ikke ut til å ha noen positiv effekt på vekst.

3.1.2 Isolat AL-2257

Isolat AL-2257, *Pasteurella* sp, er som oppgitt i tabell 2.1, isolert fra atlantisk laks fra Nord-Norge. Dataene for isolat AL-2257 er presentert i tabell 3.1.4 og 3.1.5 To parallellskåler ble inokulert for hver komponent som ble testet.

Tabell 3.1.4: Tabellen viser resultatene for de ulike skålene; Type komponent som er testet, atmosfære den har blitt inkubert i samt antall cfu og medianen målt i mm.

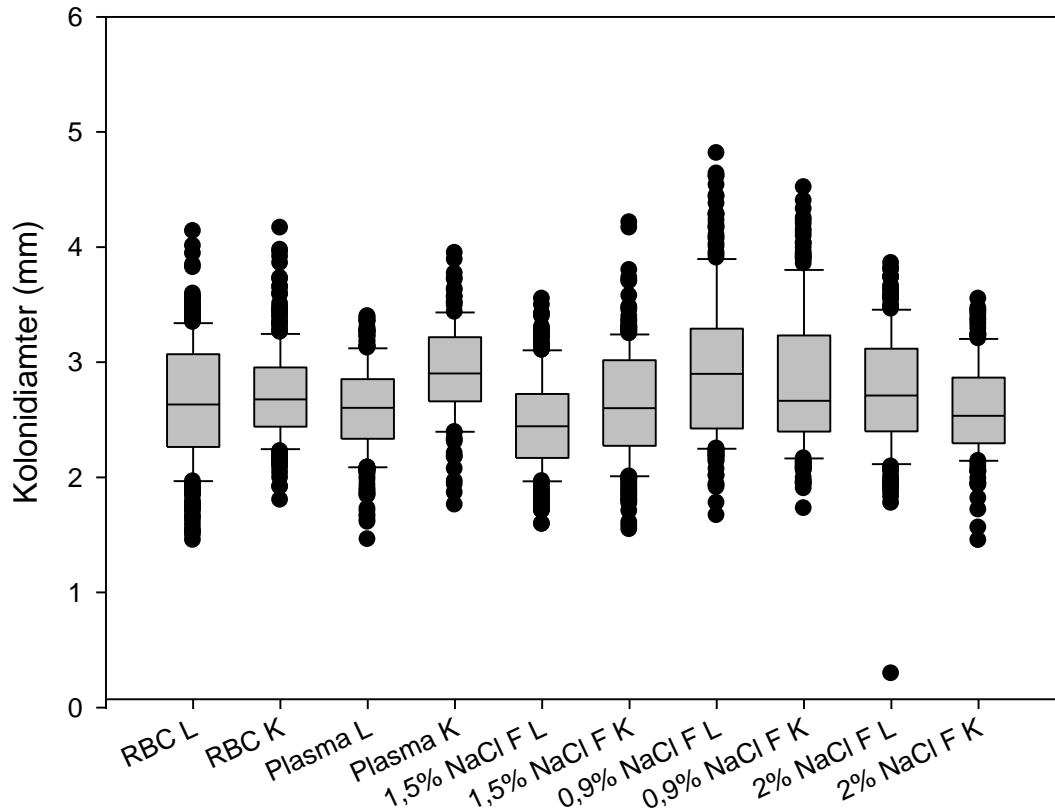
Atmosfære:	Medium:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft:	BA 1,5% NaCl	213	2,494
		234	2,373
	BAB 1,5% NaCl	240	2,603
	5% Plasma	255	2,606
	BAB 1,5% NaCl	228	2,742
	5% RBC	235	2,462
CO ₂ :	BA 1,5% NaCl	252	2,641
		243	2,592
	BAB 1,5% NaCl	65	2,800
	5% Plasma	87	3,037
	BAB 1,5% NaCl	203	2,813
	5% RBC	230	2,604

Tabell 3.1.5: Kolonidiametermåling av 2257 på ulike saliniteter. Det ble benyttet ulike bakteriesuspensjoner for 0,9% NaCl og 2% NaCl.

Atmosfære:	Medium:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft:	BA 2% NaCl	171	2,619
		159	2,960
	BA 0,9% NaCl	143	2,774
		150	3,015
CO ₂ :	BA 2% NaCl	141	2,469
		139	2,570
	BA 0,9% NaCl	166	2,544
		154	2,750

Figur 5 viser alle målingene illustrert ved boksplokk. Parallellskålene er summert slik at hver boks inkluderer målingene fra begge skålene. Inkubasjon i luft er merket med «L», inkubasjon i CO₂-anriket atmosfære er merket med «K». Både tabell 3.1.4 og 3.1.5 er inkorporert i figur 5.

AL-2257, Salinitet og blodfraksjoner



Figur 5:

Figur 5 viser 1., 2. (medianen) og 3. kvartil for kolonidiameteren for isolat AL-2257 dyrket på BAB med blodfraksjoner, fullblod og ulike saliniteter.

Statistiske analyser av dataene i tabell 3.1.4 viste en signifikant større kolonidiameter median ved bruk av CO₂ i syv av tolv tilfeller. Fire av tilfellene gjaldt ved bruk av BAB 1,5% NaCl 5% plasma. Ved bruk av CO₂ anriket atmosfære gav dette mediet vesentlig færre kolonier av AL-2257, men de var altså signifikant større enn det man fant ved inkubering i luft. De resterende fem sammenligningene gav ingen signifikante forskjeller på kolonidiameterstørrelse.

Samme sammenligning dyrket på CO₂ gav en signifikant større kolonidiameter ved bruk av 1,5% NaCl BAB 5% plasma for begge parallellskåler, men cfu antallet var som sagt mye lavere.

Statistiske analyser av dataene i tabell 3.1.5 viste ingen signifikant forskjell mellom inkubering i ulike atmosfære samt dyrkning på 0,9% NaCl vs. 2% NaCl.

Oppsummert vokste isolat 2257 generelt godt på alle medier, CO₂ anriket atmosfære gav færre cfu ved bruk av BAB 1,5% NaCl 5% plasma enn de resterende dyrkingsforholdene.

3.1.3 Isolat PS-9389

Isolat PS-9389, *Pasteurella skyensis*, er som oppgitt i tabell 2.1, isolert fra atlantisk laks fra Skottland. Dataene for PS-9389 er presentert i tabell 3.1.6 og 3.1.7 To parallellskåler ble inokulert for hver komponent som ble testet.

Tabell 3.1.6: Tabellen viser resultatene for de ulike skålene; Type komponent som ble testet, inkuberingsatmosfære samt antall cfu og medianen målt i mm.

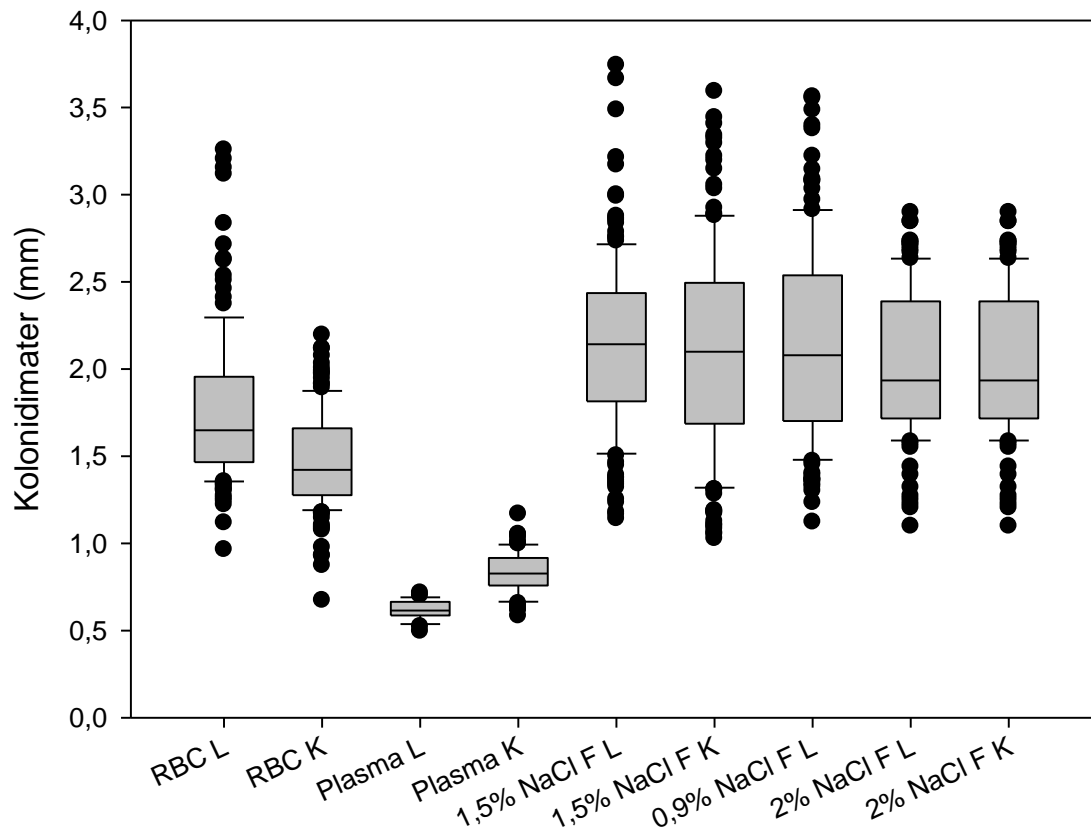
Atmosfære:	Medium:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft:	BA 1,5% NaCl	115	2,115
		99	2,183
	BAB 1,5% NaCl 5% Plasma	16	0,615
		7	0,621
	BAB 1,5% NaCl 5% RBC	86	1,672
		87	1,647
CO ₂ :	BA 1,5% NaCl	84	2,176
		92	1,960
	BAB 1,5% NaCl 5% Plasma	95	0,857
		17	0,763
	BAB 1,5% NaCl 5% RBC	106	1,382
		94	1,569

Tabell 3.1.7: Resultater for PS-9389 dyrket på BA med ulik salinitet. To bakteriesuspensjoner ble benyttet.

Atmosfære:	Medium:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft	BA 2% NaCl	69	2,244
		85	1,938
	BA 0,9% NaCl	49	1,339
		61	1,361
CO ₂	BA 2% NaCl	65	1,878
		66	2,007
	BA 0,9% NaCl	0	
		0	

Figur 6 viser målingene illustrert ved boksploTT. Parallellskålene er summert slik at hver boks inkluderer målingene fra begge skålene. Inkubasjon i luft er merket med «L», inkubasjon i CO₂-anriket atmosfære er merket med «K». Både tabell 3.1.6 og 3.1.7 er inkorporert i figur 6.

PS-9389, Salinitet og blodfraksjoner



Figur 6: Figur 6 viser 1., 2. (medianen) og 3. kvartil for kolonidiameteren for isolat PS-9389 dyrket på BAB med blodfraksjoner, fullblod og ulike saliniteter. L (luft) og K (CO₂ anriket atmosfære) viser inkuberingsatmosfæren.

Statistiske analyser ble gjennomført på dataene fra tabell 3.1.6, de viste at fullblod gav signifikant høyere kolonidiameter enn bruk av plasma og RBC som tilsetning. Ved dyrking på luft vs. CO₂ anriket atmosfære på BA 1,5 % NaCl 5% fullblod ble det ikke funnet signifikante forskjeller.

BA 2% NaCl hadde signifikant større kolonidiameter enn BA 0,9% NaCl. Ved analysing av gruppene BA 2% NaCl og BA 1,5% NaCl (gruppene hadde blitt dyrket på ulike tidspunkt men hadde relativt likt cfu antall) gav ingen statistisk signifikante forskjeller.

Ved dyrking i CO₂ anriket atmosfære fikk man ikke vekst på BA 0,9% NaCl.

3.1.4 Isolat AL-9523

Isolat AL-9523, *Pasteurella* sp., er som oppgitt i tabell 2.1, isolert fra atlantisk laks fra Sør-Norge. Dataene for isolat AL-9523 er presentert i tabell 3.1.8 og 3.1.9.

To parallellskåler ble inokulert for hver komponent som ble testet.

Tabell 3.1.8: Tabellen viser resultatene for de ulike skålene; Type komponent som ble testet, atmosfære den ble inkubert i samt antall cfu og medianen målt i mm. To bakteriesuspensjoner ble benyttet, en for hver salinitet.

Atmosfære:	Gruppe:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft:	BA 2% NaCl	220	1,393
		230	1,305
	BA 1,5% NaCl 5% Plasma	138	0,880
		141	1,206
		BA 1,5% NaCl 5% RBC	240
CO ₂ :	BA 2% NaCl	316	0,937
		269	1,312
	BA 1,5% NaCl 5% Plasma	281	1,378
		130	1,256
		150	1,249
BA 1,5% NaCl 5% RBC	185	1,211	
	281	1,244	

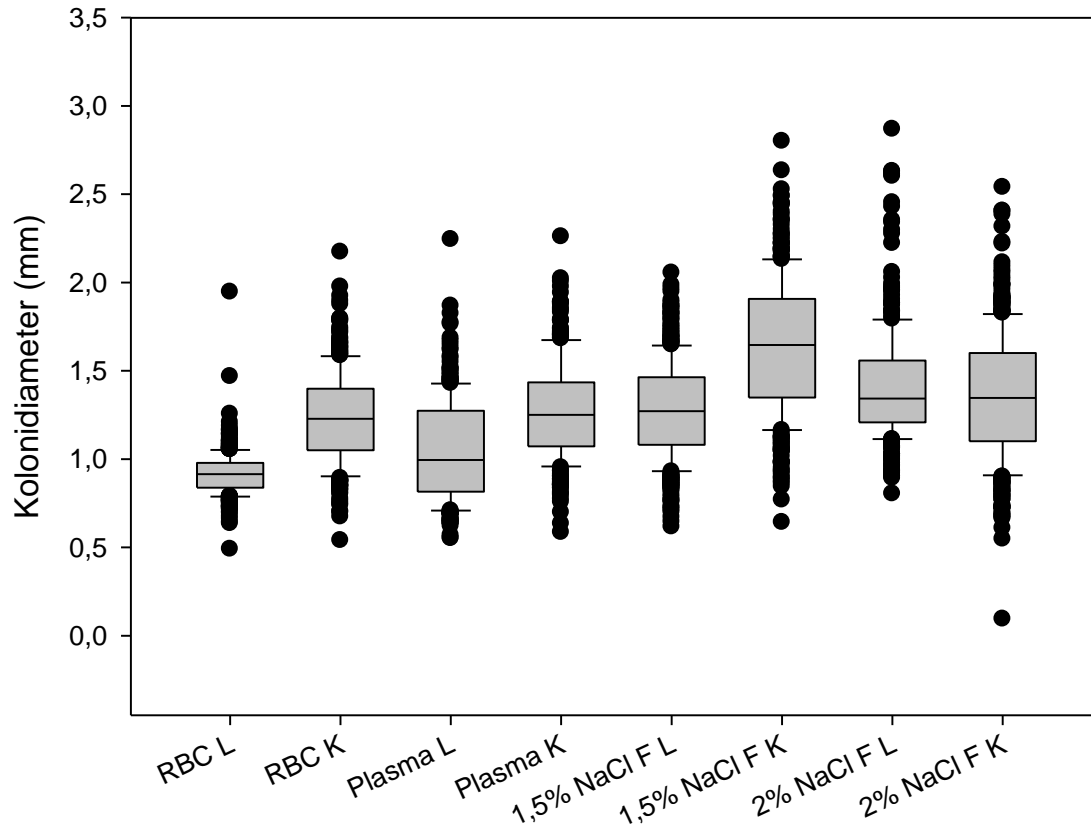
Tabell

3.1.9: Tabellen viser resultatene for de ulike skålene; Type komponent som ble testet, atmosfære den ble inkubert i samt antall cfu og medianen målt i mm. To bakteriesuspensjoner ble benyttet.

Atmosfære:	Gruppe:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft:	BA 1,5% NaCl	277	1,259
		232	1,293
	BA 0,9% NaCl	0	
		0	
CO ₂ :	BA 1,5% NaCl	210	1,616
		235	1,668
	BA 0,9% NaCl	0	
		0	

Figur 7 viser målingene av AL-9523 illustrert ved boksplott. Parallellskålene er summert slik at hver boks inkluderer målingene fra begge skålene. Inkubasjon i luft er merket med «L», inkubasjon i CO₂-anrikt atmosfære er merket med «K». Både tabell 3.1.8 og 3.1.9 er inkorporert i figur 7.

AL-9523, Salinitet og blodfraksjoner



Figur 7: Figur 7 viser 1., 2. (medianen) og 3. kvartil for kolonidiameteren for isolat AL-9523 dyrket på BAB med blodfraksjoner, fullblod og ulike saliniteter. L (luft) og K (CO₂ anriket atmosfære) viser inkuberingsatmosfæren.

Statistiske analyser viste at fullblod gav større kolonidiameter enn RBC og plasma i alle tilfellene ved dyrking i luft. Det var for øvrig ulik salinitet på gruppene, som vist i tabell 3.1.8.

Sammenligning av kolonier dyrket på BA 1,5% NaCl og BA 2% NaCl inkubert i luft gav ingen signifikante ulikheter. AL-9523 gav som vist i tabell 3.1.9 ingen vekst på BA 0,9% NaCl.

Sammenligning av kolonidiameter ved dyrking i luft vs. CO₂ anriket atmosfære gav ingen signifikante forskjeller ved dyrking på BA 2% NaCl. Ved dyrking på BA 1,5 % NaCl var kolonidiameteren signifikant større ved dyrking i CO₂ anriket atmosfære på begge parallellskålene.

Oppsummert viste isolat AL-9523 bedre vekst på fullblod enn på plasma. Ved tilsetning av RBC fikk man et høyt antall cfu, men kolonidiameteren var lavere enn ved dyrking på fullblod. God

vekst på 1,5-2% NaCl, isolat AL-9523 vokste ikke ved en salinitet på 0,9% NaCl. CO₂ anriket atmosfære så ikke ut til å ha en positiv effekt.

3.1.5 Isolat AL-4081

Isolat AL-4081, *Pasteurella* sp., er som oppgitt i tabell 2.1, isolert fra atlantisk laks fra Sør-Norge. Dataene for isolat AL-4081 er presentert i tabell 3.1.10 og 3.1.11. To parallellskåler ble inokulert for hver komponent som ble testet.

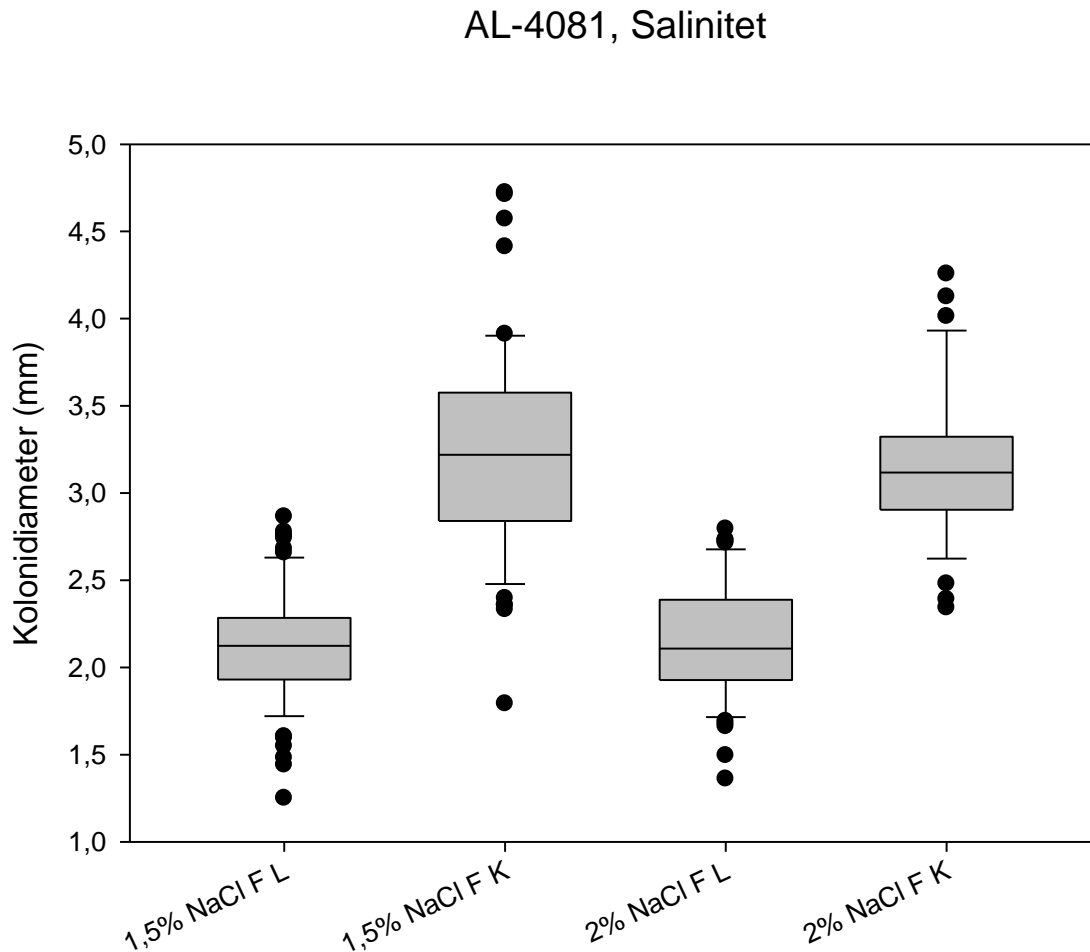
Tabell 3.1.10: Tabellen viser resultatene for de ulike skålene; Type komponent som er testet, atmosfære den ble inkubert i samt antall cfu og medianen målt i mm. Tre bakteriesuspensjoner ble benyttet, en for hver salinitet.

Atmosfære:	Gruppe:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft	BA 0,9% NaCl	0 cfu	
		0 cfu	
	BA 1,5% NaCl	42 cfu	2,075
		44 cfu	2,181
	BA 2% NaCl	29 cfu	2,081
		26 cfu	2,269
CO ₂	BA 0,9% NaCl	0 cfu	
		0 cfu	
	BA 1,5% NaCl	39 cfu	3,168
		17 cfu	3,340
	BA 2% NaCl	21 cfu	3,117
		14 cfu	3,058

Tabell 3.1.11: Kolonidiameter ble ikke målt da antall cfu var for høyt på kontrollskål (BA 1,5% NaCl). Grunnet lav vekst på blodfraksjoner ble det ikke testet på nytt.

Atmosfære:	Medium:	N (antall cfu):
Luft	BA 1,5% NaCl	Ca 450 cfu
		Ca 450 cfu
	BAB 1,5% NaCl 5% Plasma	2 cfu
		5 cfu
CO ₂	BA 1,5% NaCl	10 cfu
		11 cfu
	BAB 1,5% NaCl 5% Plasma	Ca 450 cfu
		Ca 450 cfu
BAB 1,5% NaCl 5% RBC	1 cfu	
	0 cfu	
BAB 1,5% NaCl 5% RBC	3 cfu	
	0 cfu	

Figur 8 viser målingene illustrert ved boksplott. Parallellskålene er summert slik at hver boks inkluderer målingene fra begge skålene. Inkubasjon i luft er merket med «L», inkubasjon i CO₂-anriket atmosfære er merket med «K». Tabell 3.2.9 er inkorporert i figur 8.



Figur 8: Figur 8 viser 1., 2. (medianen) og 3. kvartil for kolonidiameteren for isolat AL- 4081 dyrket på BA fullblod med 1,5% NaCl og 2% NaCl. L (luft) og K (CO₂ anriket atmosfære) viser inkuberingsatmosfæren.

Dataene i tabell 3.1.10 ble statistisk analysert og viste at kolonidiameteren var signifikant større i alle tilfeller ved dyrking i CO₂ anriket atmosfære både ved dyrking på BA 1,5% NaCl og BA 2% NaCl. Antallet cfu var lavere ved dyrking på CO₂ i alle tilfeller. Ingen signifikante ulikheter ble funnet ved sammenligning av BA 1,5% NaCl og BA 2% NaCl dyrket på luft.

Oppsummert var AL-4081 ikke i stand til å utnytte blodfraksjoner, det viste kun tilstrekkelig vekst på fullblod. Bakterien viste god vekst ved 1,5-2% NaCl, den vokste ikke ved 0,9% NaCl. Koloniantallet var lavere ved bruk av CO₂ anrikt atmosfære, men medianen av kolonidiameteren var signifikant høyere. Det er derfor vanskelig å si hvilken effekt CO₂ anrikt atmosfære hadde.

3.1.6 Isolat RK-9758

Isolat RK-9758, *Pasteurella* sp., er som oppgitt i tabell 2.1, isolert fra rognkjeks fra Vest-Norge. Dataene for isolat 9758 er presentert i tabell 3.1.12 og 3.1.13. To parallellskåler ble inokulert for hver komponent som ble testet.

Tabell 3.1.12: Tabellen viser resultatene for de ulike skålene; Type komponent som er testet, atmosfære den har blitt inkubert i samt antall cfu og medianen målt i mm.

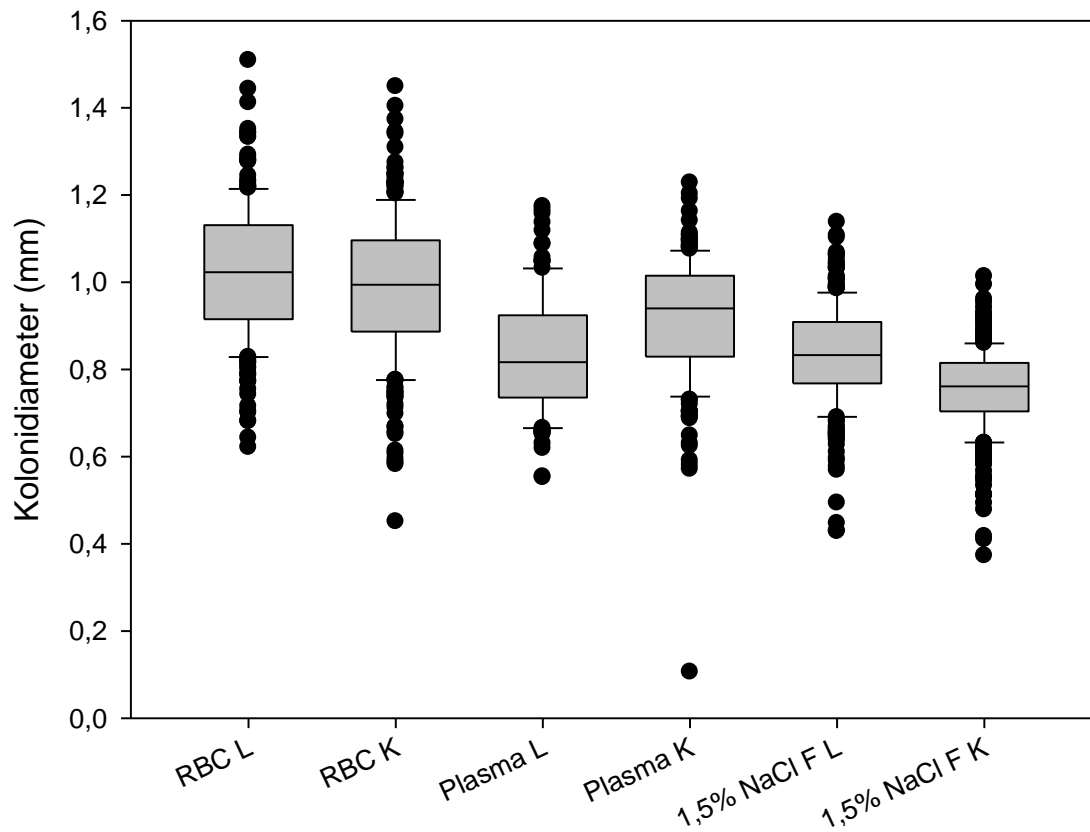
Atmosfære:	Gruppe:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft	BA 1,5% NaCl	151	0,846
		188	0,825
	BAB 1,5% NaCl	122	0,817
	5% Plasma	Forurenset	
	BAB 1,5% NaCl 5% RBC	166 142	1,044 0,997
CO ₂	BA 1,5% NaCl	211	0,746
		165	0,782
	BAB 1,5% NaCl	145	0,948
	5% Plasma	124	0,938
	BAB 1,5% NaCl 5% RBC	140 159	0,955 1,031

Tabell 3.1.13: Tabellen viser resultatene for de ulike skålene; Type komponent som er testet, atmosfære den har blitt inkubert i samt antall cfu og medianen målt i mm. To ulike bakteriesuspensjoner ble benyttet, en for hver salinitet.

Atmosfære:	Gruppe:	N (antall cfu):	Median (mm):
Luft	BA 2% NaCl	Ca 500	0,492
		Ca 500	0,513
CO ₂ :	BA 0,9% NaCl	0 cfu	
		0 cfu	
Luft	BA 2% NaCl	Ca 500	0,582
		Ca 500	0,598
CO ₂ :	BA 0,9% NaCl	0 cfu	
		0 cfu	

Figur 9 viser målingene fra 3.1.12 illustrert ved boksplokk. Den ene parallellskålen av BAB 1,5% NaCl 5% plasma inkubert på luft var forurenset og ble derfor ikke målt. Ellers er parallellskålene summert slik at hver boks inkluderer målingene fra begge skålene. Inkubasjon i luft er merket med «L», inkubasjon i CO₂-anrikt atmosfære er merket med «K». Resultatene fra tabell 3.1.13 er ikke inkludert på grunn av den store forskjellen i cfu antall.

RK-9758, Blodfraksjoner



Figur 9: Figur 9 viser 1., 2. (medianen) og 3. kvartil for kolonidiameteren for isolat RK-9758 dyrket på BAB 1,5% NaCl tilsatt henholdsvis RBC, plasma og fullblod. L (luft) og K (CO₂ anriket atmosfære) viser inkuberingsatmosfæren.

Statistiske analyser viste at ved bruk av 5% RBC fikk man signifikant større kolonidiameter i fire av fire tilfeller forhold til bruk av 5% fullblod. Koloniantallet var relativt likt. Sammenligning av bruk av 5% fullblod i forhold til 5% plasma gav ingen signifikante forskjeller.

Statistiske analyser av dataene i tabell 3.1.12 viste i tre av fire tilfeller signifikante større forskjeller i kolonidiameteren ved inkubering i luft i forhold til inkubering i CO₂ anriket atmosfære ved dyrking på BA 1,5% NaCl. Ved atmosfæresammenligning ved dyrking på BAB 1,5% NaCl 5% RBC var det ingen signifikante forskjeller. Ved dyrking på BAB 1,5% NaCl 5% plasma viste to av to tilfeller at CO₂-anriket atmosfære gav signifikant større kolonidiameter.

Sammenligning av kolonidiameter ved dyrking på ulik salinitet ble ikke gjennomført da de store forskjellene i koloniantall sannsynligvis ville påvirke resultatet for mye.

Oppsummert viste RK-9758 signifikant større vekst ved dyrking BAB tilsatt 5% RBC, enn på henholdsvis 5% plasma og 5% fullblod. Veksten ser ut til å være bedre på fullblod enn på plasma. Bakterien vokste godt ved en salinitet på 1,5%-2% NaCl, den vokste ikke ved 0,9% NaCl. CO₂ anriket atmosfære så ikke ut til å ha positiv effekt.

3.1.7 Oppsummering av vekstforsøk på fast medium

Det isolatet som skilte seg mest ut, vekstmessig og morfologisk, var AL-2257. Isolatet hadde store (ca 3 mm ved dyrking på BA 2% NaCl), bløte kolonier som løste seg lett i saltvann. Isolatet vokste raskt og generelt godt på alle medier, det var det eneste isolatet som vokste på TSA 2% NaCl uten tilsetninger. Det vokste også ved tilsetning av uorganiske jernkilder med TSA 2% NaCl som base.

Mellom lakseisolatene PS-9389, AL-9523 og AL-4081 var det flere likheter. De tre isolatene hadde alle en kolonidiameter på ca. 2 mm ved dyrking på BA 2% NaCl. PS-9389 var lett å løse i saltvann, mens AL-9523 og AL-4081 var noe «tørrere», noe som gjorde det vanskeligere å løse dem jevnt i suspensjon. Alle isolatene hadde best vekst på fullblod med salinitet på 1,5-2% NaCl. Vekst på 0,9% NaCl varierte mellom isolatene. PS-9389 hadde en intermediær vekst ved 0,9% NaCl inkubert på luft, mens ved tilsetning av ekstra CO₂ i atmosfæren vokste den ikke i det hele tatt på 0,9% NaCl. Isolatene AL-9523 og AL-4081 vokste ikke på 0,9% NaCl.

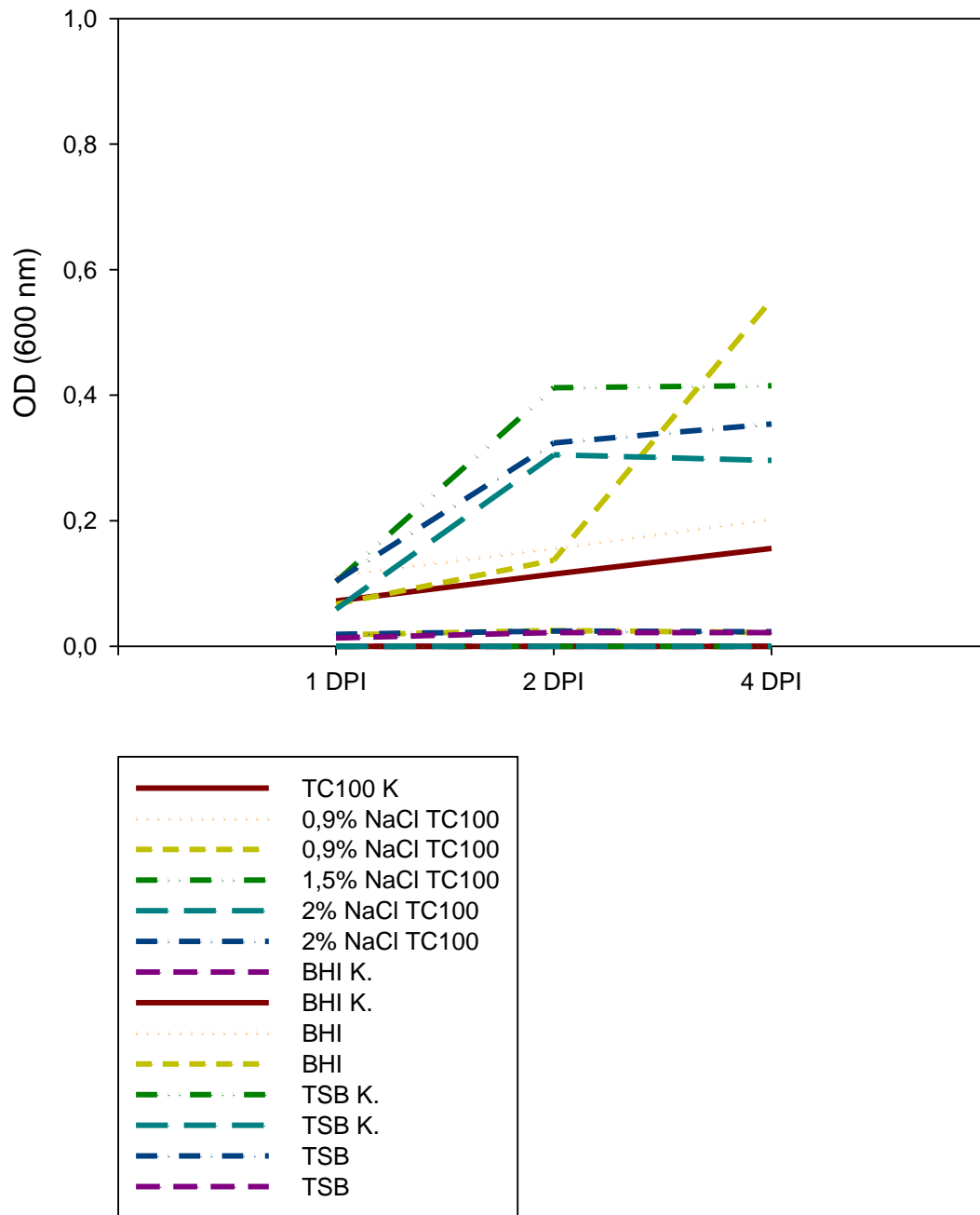
CO₂ anriket atmosfære så ikke ut til å ha noen positiv effekt for hvert av de tre isolatene.

Rognkjeksisolatene RK-9100 og RK-9758 hadde morfologisk mange likheter, som størrelse (ca. 1 mm ved dyrking på BA 2% NaCl) samt at begge isolatene gav «tørre» kolonier som gjorde dem noe vanskelig å løse i en jevn suspensjon. Isolatene vokste best ved en salinitet på 1,5-2% NaCl i mediet, de vokste ikke ved 0,9% NaCl. CO₂ anriket atmosfære påvirket ikke veksten positivt. RK-9758 ser ut til å kunne utnytte blodfraksjoner bedre enn RK-9100. Dyrkningsforsøk der ulike blodfraksjoner ble benyttet, ble kun gjennomført en gang men med to parallellskåler for RK-9758.

3.2 Flytende medier

Flere ulike flytende medier ble forsøkt (se tabell 2.2) for isolat RK-9100. Figur 10 viser vekstkurven til mediene; TC 100 med ulike saliniteter (0,9% NaCl, 1,5% NaCl og 2% NaCl), BHI (1,5% NaCl) og TSB (1,5% NaCl). Forsøket ble avbrutt 4 dager post inokulering (DPI) på grunn av manglende vekst (maksimal OD var på 0,552). Samtidig som kolbene med flytende medium ble inokulert, ble også 50 µl sådd ut på BA 1,5% NaCl fra hver kolbe for å få en positiv kontroll. Alle de positive kontrollene viste god vekst (teppevekst av bakterier). Ved siste uttak ble 50 µl igjen sådd ut fra hver kolbe til BA 1,5% NaCl. Veksten var tilsvarende som første gangen, noe som tyder på at bakteriene har overlevd i mediene, men målingene av OD underveis viste svært lav vekst.

RK-9100, Ulike flytende medier



Figur 10: K: negativ kontroll. Resten av kolbene er inokulert med isolat RK-9100. 0,9% NaCl TC100 viser best vekst (OD: 0,552 abs) etter 4 døgn inkubering.

Et pilotforsøk med bruk av TSB tilsatt 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment

1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053 med ulike saliniteter (0,9% NaCl, 1,5% NaCl og 2% NaCl) ble gjennomført før man prøvde samme tilsetninger på agar.

Ved preparering av Soluble Haemoglobin Powder LP0053 løsningen ble det raskt klart at mediet ville bli for opakt til at man kunne måle vekst ved OD. En 10^{-3} fortykning ble derfor sådd ut fra den ene parallellkolben fra hver gruppe, hver dag. Første utsåing ble gjennomført etter et døgn inkubasjon. Den positive kontrollen viste god vekst (teppevekst). Etter to dager inkubasjon var koloniantallet for høyt til at man kunne skille enkeltkolonier. Resultatet er vist i tabell 3.2.1.

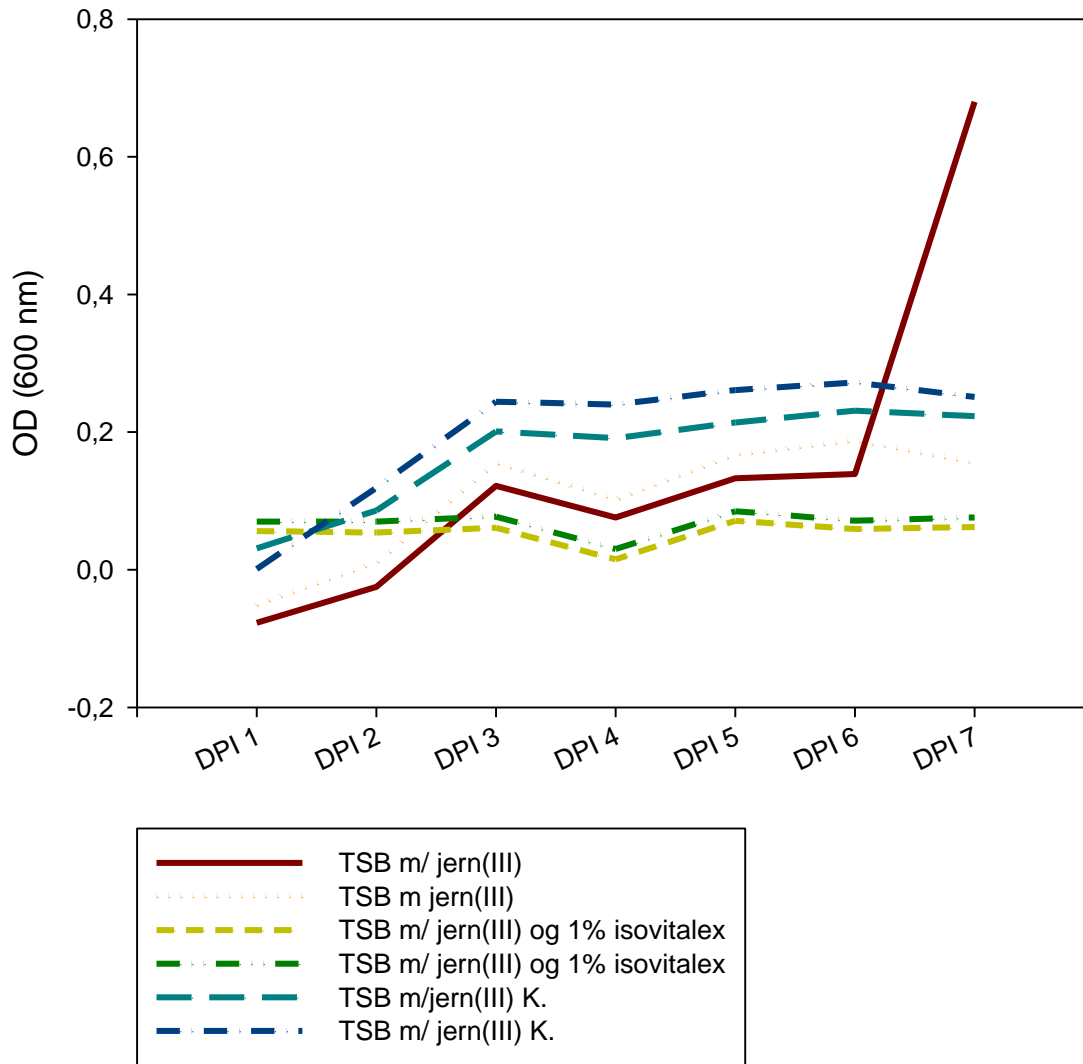
Tabell 3.2.1: Tabellen viser antall cfu fra 10^{-3} fortykning sådd ut fra tre kolber med ulik salinitet (0,9% NaCl, 1,5% NaCl og 2% NaCl) dyrket i mediet TSB tilsatt 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment og 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053. K: negativ kontroll, -: ingen vekst, TMTC: teppevekst (*Too many to count*). DPI: dager post inkulering.

Medium:	1 DPI	2 DPI
0,9% NaCl K.	-	-
0,9% NaCl	1000	TMTC
1,5% NaCl	TMTC	TMTC
2% NaCl	TMTC	TMTC

RK-9100 ble også forsøkt dyrket i TSB 1,5% NaCl tilsatt 2 mM jern(III)klorid hexahydrat og TSB 1,5% NaCl tilsatt 2 mM jern(III)klorid hexahydrat og 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment. To kolber med TSB 1,5% NaCl tilsatt 2 mM jern(III)klorid hexahydrat fungerte som negativ kontroll. Positiv kontroll var to skåler med BA 1,5% NaCl som ble sådd ut direkte fra suspensjon, disse viste god vekst (teppevekst).

Måling av OD ble gjennomført etter inkulering og deretter ved tilnærmet samme tidspunkt de neste seks dagene. Målingene er vist i figur 11, begge parallellkolbene for hvert medium ble målt. Stor variasjon i OD gav mistanke om utfelling eller forurensing i mediet. Det ble derfor sådd ut en fortykningsrekke (10^{-3} - 10^{-8}) fra en kolbe fra hver gruppe, hver dag. Samme kolbe ble benyttet hver gang og suspensjonen ble sådd ut på BA 1,5% NaCl som ble inkubert i 5 dager. Resultatet er oppsummert i tabell 3.2.2

RK-9100, TSB m/ 2mM jern(III)klorid og 1% isovitalex



Figur 11: Vekstkurver for RK-9100 basert på OD. Mediene som ble testet var TSB 1,5% NaCl m/ 2mM jern(klorid) hexahydrat og TSB 1,5% NaCl m/ 2mM jern(klorid) hexahydrat og 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment. K: Negativ kontroll. Maksimal vekst var i TSB 1,5% NaCl m/ 2mM jern(klorid) hexahydrat med OD: 0,680, denne veksten ble ikke vist i parallellkolben (oransje linje).

Tabell 3.2.2: Fortynningsrekke av RK-9100, dyrket i TSB 1,5% NaCl tilsatt 2 mM jern(III)klorid hexahydrat og TSB 1,5% NaCl tilsatt 2 mM jern(III)klorid hexahydrat og 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment. Tabellen viser antall cfu og gir et bilde på vekst for de ulike mediene. TMTC: Too many to count, -: ingen vekst

Fra medium:	Fortynning:	DPI 1	DPI 2	DPI 3	DPI 4	DPI 5	DPI 6	DPI 7
TSB 1,5% NaCl 2 mM jern(III)klorid hexahydrat	10 ⁻³	TMTC	500 cfu	184 cfu	7 cfu	4 cfu	-	-
	10 ⁻⁴	TMTC	45 cfu	19 cfu	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	301 cfu	12 cfu	3 cfu	-	-	-	-
	10 ⁻⁶	39 cfu	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁷	1 cfu	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁸	1 cfu	-	-	-	-	-	-
TSB 1,5% 2 mM jern(III)klorid hexahydrat og 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment	10 ⁻³	TMTC	51	5	-	5	-	-
	10 ⁻⁴	TMTC	8	1	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	305	3	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁶	37	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-	-
TSB 1,5% NaCl 2 mM jern(III)klorid hexahydrat Negativ Kontroll	10 ⁻³	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁴	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁷	-	-	-	-	-	-	-
	10 ⁻⁸	-	-	-	-	-	-	-

Figur 11 viser en svak økning i OD, noe som kan gjenspeile vekst, men bakterieveksten illustrert av tabell 3.2.2 viser det motsatte. Figur 11 viser en økning i OD også for de negative kontrollene, ved utsåing på skål slik det fremgår av tabell 3.2.2 finner man ikke tegn til forurensing.

3.3 Oxoid™ X, V og XV-faktor test

Oxoid™ X, V og XV-faktor test ble gjennomført to ganger. Den første gangen ble testen gjennomført med diskene som hadde blitt oppbevart to uker i romtemperatur. Ifølge produsentene skal diskene lagres ved -20°C-8°C. Produsentene hadde ingen data på hva som skjer ved feil

oppbevaring og gav derfor råd om at diskene ikke burde brukes. De er allikevel ført inn i tabell 3.3.1 merket med *.

Tabell 3.3.1: Resultat for gjennomføring av Oxoid™ X, V og XV-faktor test. Testen ble kun gjennomført på isolat RK-9100. Test 1 merket med * fortynning 10^{-4} , (gyldig) test 2: fortynning 10^{-5} . IG: Ikke gjennomført, (-): ingen endring, (+): større cfu, (H): Hemmingssone, *: første test (ikke gyldig)

	Luft				CO ₂			
	+ kontroll	X- test	V- Test	XV-test	+ kontroll	X- test	V- test	XV- test
TSA 0,5% NaCl*	0 cfu*	0 cfu*	0 cfu*	0 cfu*	IG	IG	IG	IG
TSA 0,5% NaCl	0 cfu	0 cfu	0 cfu	0 cfu	IG	IG	IG	IG
TSA 2% NaCl*	0 cfu*	1 cfu/ 20 cfu rundt disk*	0 cfu*	Ca 40 små cfu rundt disk*	IG	IG	IG	IG
TSA 2% NaCl	0 cfu	0 cfu	0 cfu	0 cfu	IG	IG	IG	IG
TSA 0,9% NaCl + 1% BBL™ IsoVitalX™ Enrichment + 1% Soluble Haemoglobin Powder	Ca 1000 cfu	-	-	-	-	-	-	-
TSA 1,5% NaCl + 1% BBL™ IsoVitalX™ Enrichment	Ca 1000 cfu	-	-	-	IG	IG	IG	IG
BA 0,9% NaCl*	0 cfu	0 cfu*	0 cfu*	0 cfu*	IG	IG	IG	IG
BA 1,5% NaCl	Ca 1000 cfu	-	-	-	-	-	-	-
BA 2% NaCl*	Ca 1000 cfu	H*	-*	-*	IG	IG	IG	IG
BA 2% NaCl	Ca 1000 cfu	-	-	-	IG	IG	IG	IG
BA 1,5 % NaCl + 5% RBC	Ca 1000 cfu	+	-	+	IG	IG	IG	IG
BA 1,5 % NaCl + 5% plasma	0 cfu	0 cfu	0 cfu	1 cfu/ 0 cfu	IG	IG	IG	IG

Resultatene fra den første testen viste tendenser til vekst på TSA 2% NaCl rundt X-disk og XV-disk. Dette ble vist på begge paralleller.

Den første testen gav også en hemmingssone rundt X-disken på BA 2% NaCl på begge paralleller.

Ved andre gjennomføring av Oxoid™ X, V og XV-faktor test med nye disker som hadde blitt lagret ved -18°C så man ikke noe til tendensene nevnt ovenfor.

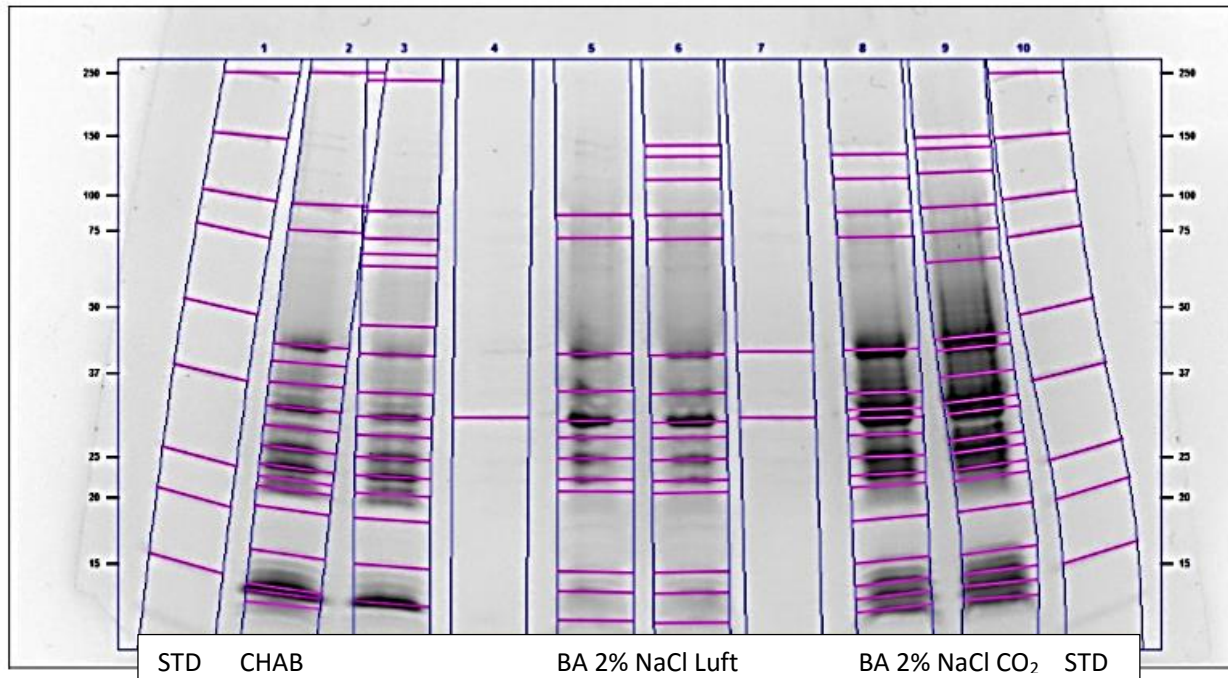
X- og XV-disker gav noe større kolonistørrelse enn + kontroll og V-disk på BAB 1,5 % NaCl + 5% RBC. Her var kolonistørrelsen mindre enn på BA 1,5% NaCl.

3.4 SDS-PAGE

SDS-PAGE ble gjennomført da man oppdaget at RK-9100 tilsynelatende endret egenskaper ved dyrking på ulike medier. Som vist i tabell 2.4 ble det gjennomført tre elektroforeser av RK-9100 dyrket på henholdsvis CHAB og BA 2% NaCl i luft, samt BA 2% NaCl i CO₂ anrikt atmosfære (som vist tidligere vokser ikke 9100 på CHAB ved CO₂ anrikt atmosfære).

Den første elektroforesen (figur 12) ble gjennomført uten å standardisere bakteriesuspensjonen, grunnet lite bakteriematriale. De resterende elektroforesene ble gjennomført som oppgitt i kapittel 2.7. Programmet Bio Rad ChemiDoc™ XRS+ Image System ble brukt til å registrere de ulike proteinbåndene, båndene er merket med rosa på figurene. Enkelte bånd er så svake at man kan mistenke om de er reelle eller ikke. Det ble derfor opprettet paralleller i de fleste tilfeller. Programmet Bio Rad ChemiDoc™ XRS+ Image System gjorde det også mulig å regne ut proteinenes molekylærvækt ganske nøyaktig, dette er oppgitt i appendix II.

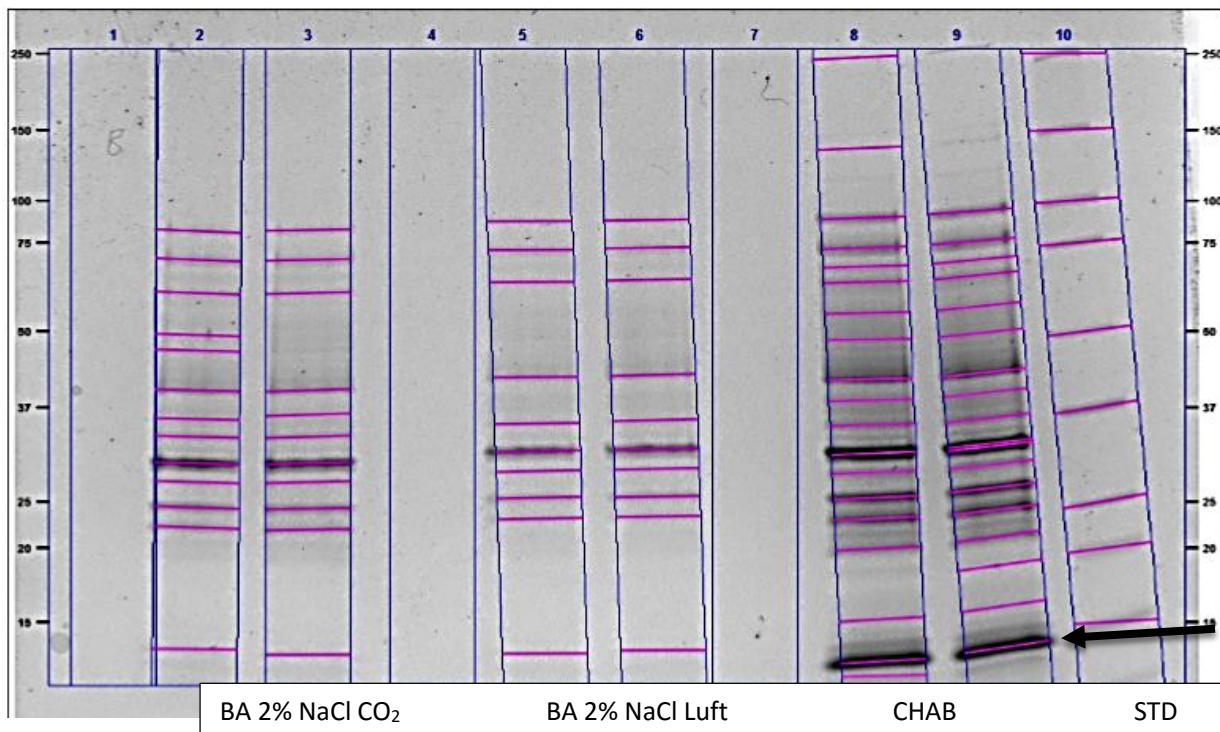
I figur 12 kan man se «smears» i flere av brønnene, noe som kan skyldes for høy bakteriemengde i bakteriesuspensjonen.



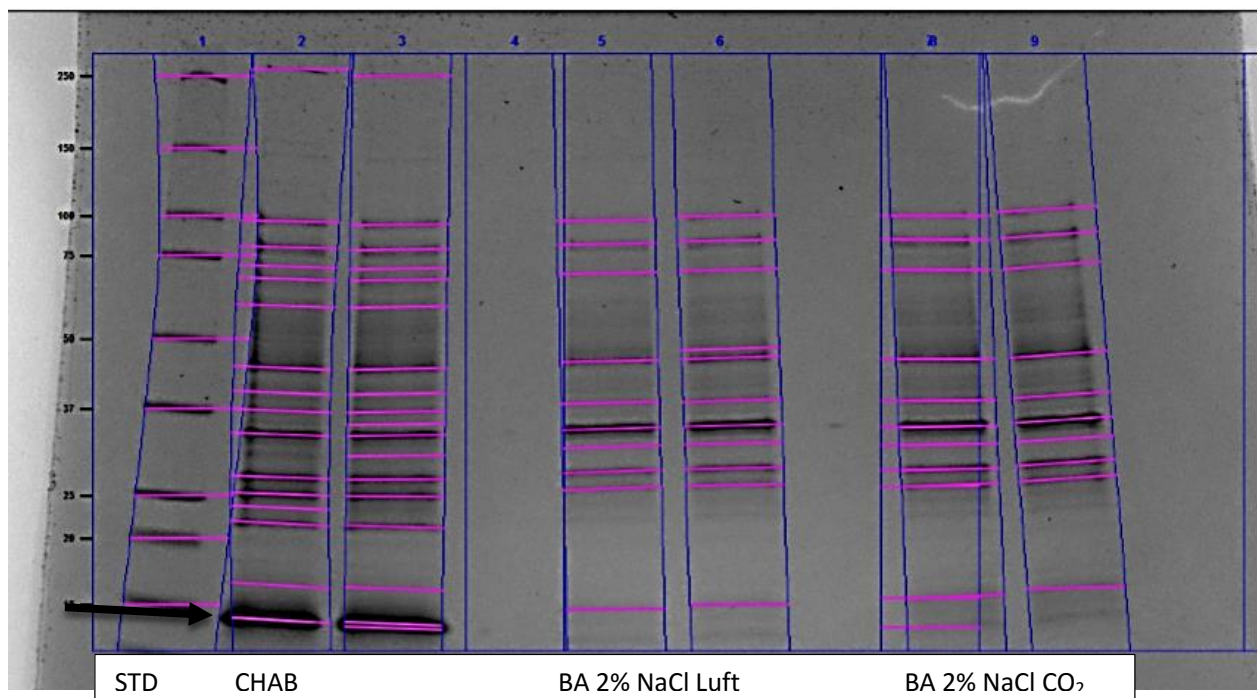
Figur 12: SDS-PAGE isolat RK-9100. To parallellbrønner for hvert medium. STD: Precision Plus Protein™ WesternC Standards.

I figur 13 og 14 er bakteriesuspensjonene standardisert, noe som burde gi et mer sammenlignbart og klarere resultat. CHAB gav noe «tørrere» kolonier som gjorde det vanskeligere å løse dem til en jevn bakteriesuspensjon. Begge figurene viser at dyrking på CHAB gir sterkere bånd med molekylærvekt på 20 kDa og 15 kDa. 15 kDa er merket med sort pil.

Man finner også noe flere klare bånd på CHAB med molekylærvekt på 25 kDa.



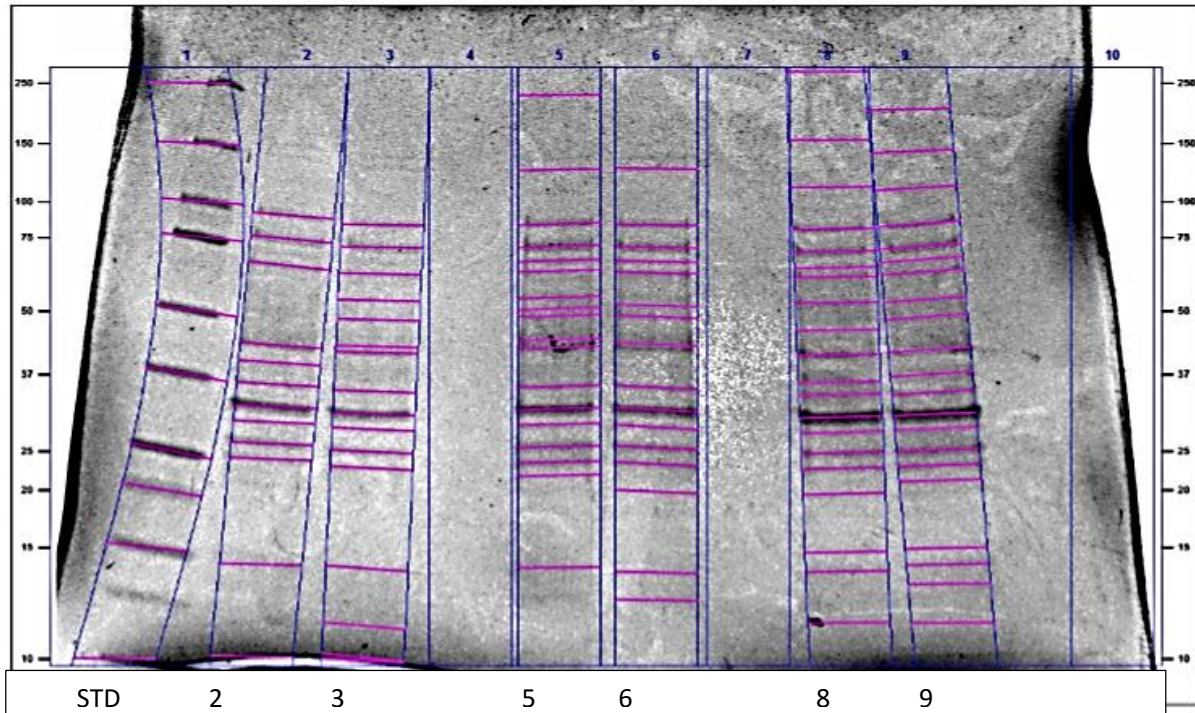
Figur 13: SDS-PAGE isolat RK-9100. To parallellbrønner for hvert medium. STD: Precision Plus Protein™ WesternC Standards. 15 kDa er merket med pil



Figur 14: SDS-PAGE isolat RK-9100. To parallellbrønner for hvert medium. STD: Precision Plus Protein™ WesternC Standards. 15 kDa er merket med pil.

SDS-PAGE ble gjennomført en gang hvor RK-9100 hadde blitt dyrket på henholdsvis BA, TSA 1,5% NaCl 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053 samt TSA 1,5% NaCl 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment og 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053, for å se om proteinuttrykkelsen skilte seg fra dyrkning på BA.

Figur 15 viser at alle gruppene er tilnærmet like.

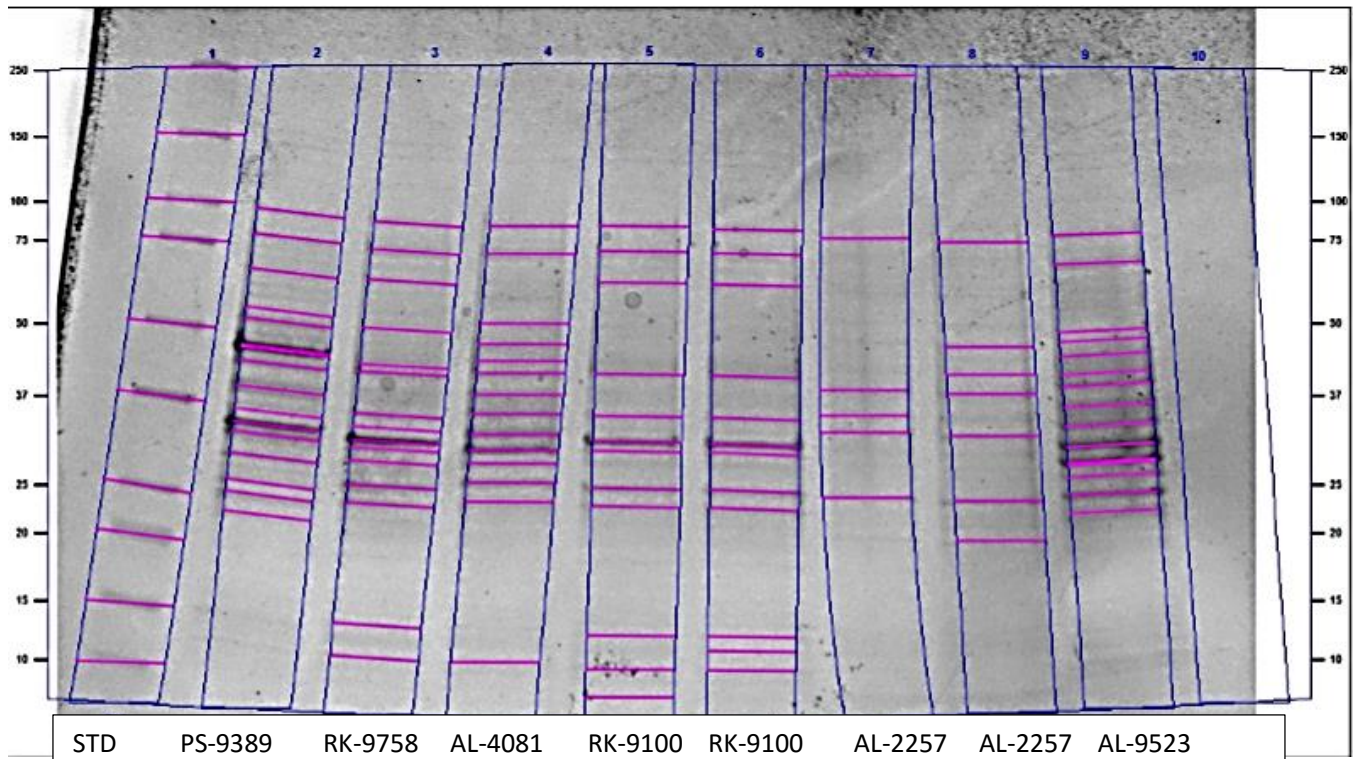


Figur 15: SDS-PAGE isolat RK-9100: Brønn 2 og 3: BA 1,5% NaCl, Brønn 5 og 6: TSA 1,5% NaCl 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053, brønn 8 og 9: TSA 1,5% NaCl 1% BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment og 1% Soluble Haemoglobin Powder LP0053. STD: Precision Plus Protein™ WesternC Standards.

SDS-PAGE ble gjennomført en gang for alle isolater for å sammenligne proteinuttrykkelsen mellom disse. Isolatene hadde i forkant blitt dyrket på BA 2% NaCl, slik det fremgår av tabell 2.4

I figur 16 kan man se resultatet. De ulike isolatene hadde bånd med både høy og lav molekylærvekt, slik det fremgår av tabell 3.4.1. Proteinprofilen til de ulike isolatene varierte noe i styrke, AL-2257 var spesielt svak og burde nok hatt en høyere bakteriemengde i suspensjonen.

Alle isolatene hadde flest bånd mellom 90-20 kDa. RK-9758, AL-4081 og RK-9100 hadde også bånd på rundt 10 kDa.



Figur 16: SDS-PAGE fra 03.09.16. Alle isolater. RK-9100 og AL-2257 har parallelbrønner. STD: Precision Plus Protein™ WesternC Standards.

Tabell 3.4.1: SDS-PAGE fra 09.03.16. Molekylærvægt vist i kDa. Rød skrift viser bånd som skiller RK-9758 og RK-9100.

PS-9389	RK-9758	AL-4081	RK-9100	RK-9100	AL-2257	AL-2257	AL-9523
91,1	84,3	83,5	83,9	81,7	232,6	74,6	78,7
75,6	71	70,6	71,7	70,9	76,9	46,1	67,4
63,9	61,6	51	62	61,3	38,9	41,2	49
53,2	49,2	46,8	41,6	41,2	35	38,1	47,1
50,5	42,5	43,7	35,1	34,7	32,6	31,8	44,4
45,2	41,3	41,6	31,5	31,1	24,8	24,1	41,2
44,8	34,7	38,2	30,3	30		20,1	39,2
42,4	32,8	35,2	25,9	25,6			36
38,2	31	32,3	23,9	23,7			33,1
34,7	30	30,2	13,3	13,2			30,3
32,8	28,4	28,6	10,7	12			28,4
31,5	25,6	26,4	10	10,6			28,1
28,7	23,7	24,3					26,6
25,6	13,7	11					24,6
24,3	11						22,7
22,2							

4. Diskusjon

Målet med oppgaven var å kartlegge isolater av *Pasteurella* sp. (fra rognkjeks) sine næringskrav slik at et flytende medium for bruk i vaksinesammenheng kunne utvikles.

Resultatene viser at stort sett alle *Pasteurella* sp. isolatene som ble testet i oppgaven vokste best på fullblod tilsatt 1,5-2% NaCl, men det ble funnet noe variasjon mellom isolatene. Lakseisolatet AL-2257 skilte seg ut ved å vokse både på lav salinitet og uten tilsatt blod. Ingen av isolatene viste økning av vekst som følge av CO₂ anriket atmosfære. Ved kartlegging av næringsbetingelser utenfor salinitet og blodfraksjoner var det hovedsakelig isolat RK-9100 fra rognkjeks som ble undersøkt. Det vokste kun godt ved tilsetning av fullblod og/eller hemoglobin til basalmediet, og ved en salinitet på 1,5-2% NaCl. Vekstpreferansene for isolatet indikerer at jern er en viktig vekstfaktor. De andre jernkildene som ble testet gav ikke vekst.

Ved bruk av mediet CHAB fra VI vokste RK-9100 på lavere salinitet, dette ble ikke vist for andre medier.

4.1 Diskusjon av resultater

Ved videre kartlegging av isolat RK-9100s næringskrav var det logisk å tenke at komponenter som man fant i både fullblod og RBC var nødvendig for vekst.

CHAB ble testet som et meget næringsrikt medium som inneholdt både hemoglobin og blod. Isolatet vokste godt på CHAB, selv om lignende saliniteter ikke gav vekst ved bruk av BA. Ved dyrking på CHAB vokste ikke bakterien i CO₂ anriket atmosfære. Bruk av CO₂ for inhibering av bakterier er en vanlig teknikk innen matproduksjon (Sivertsvik et al. 2002). For blant annet *Pseudomonas* spp., *Alteromonas putrefaciens* og *Yersinia enterocolitica* er det vist sammenheng mellom CO₂-nivå og inhibering av bakterievekst. Tilførsel av CO₂ førte til inhibering ved lavere konsentrasjoner ved dyrking på et komplekst medium, enn ved dyrking på et mindre næringsrikt medium (Gill and Tan 1979, 1980). CO₂ kan påvirke mikrobiell vekst på flere ulike måter, blant annet kan økende CO₂ konsentrasjoner påvirke metabolismen negativt (De Mattos et al. 1984), men alle mekanismer er ikke fullt ut kartlagt (Dixon and Kell 1989). Dette kan være årsaken til at isolat RK-9100 ikke vokste på CHAB i CO₂ anriket atmosfære.

Videre ble bakterien forsøkt dyrket på TSA, et medium som egner seg til vaksineproduksjon da det er kjemisk definert. Det inneholder heller ikke komponenter som kan overføre TSE. Mediet gav ikke vekst. Det ble også dokumentert at ingen av de følgende mediene gav vekst; TSB, BHIB og TC100 tilsatt 10% føtalt kalveserum.

TSB tilsatt 1% hemoglobin og 1% isovitalex ble vist av Afshar et al. (2012) å gi god vekst av den næringskrevende bakterien *Haemophilus influenzae* type b. Den samme kombinasjonen av tilsetningsstoffer ble derfor forsøkt tilsatt TSA sammen med 1,5% NaCl. RK-9100 viste svært god vekst, tilnærmet likt som på kontroll BA 1,5% NaCl. Dette resultatet gjentok seg også da man tilsatte samme tilsetningsstoffer til TSB, med saliniteter på 0,9% NaCl, 1,5% NaCl og 2% NaCl. Her viste også mediet tilsatt 0,9% NaCl god vekst (men noe mindre enn ved 1,5% NaCl og 2% NaCl).

RK-9100 vokste også på TSA 1,5% NaCl, tilsatt kun 1% Soluble Haemoglobin Powder også her tilsvarende som på kontrollen. Hemoglobin gav vekst på TSA, selv i små mengder. Dermed var det logisk å tenke at det fantes næringsstoffer i hemoglobinet som var essensielt for bakterien. Foruten organisk bundet jern, inneholder hemoglobin også flere aminosyrer blant annet cystein. Denne kan ha vært en nødvendig faktor for vekst. Men i og med at BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment og TC-100, som begge inneholdt cystein, ikke gav vekst er det sannsynlig at man trenger andre faktorer i tillegg. Jern er ofte en begrensende faktor for bakteriell vekst (Ratledge and Dover 2000), det ble derfor naturlig å fokusere på denne.

Systemet for hemoglobinopptak er ikke kjent for *Pasteurella* sp. og/eller *P. skyensis*. I andre bakterier finnes det i ulike former, enkelte reseptorer tar opp både heme og hemoglobin, mens andre er mer spesifikke for hemoglobin (Wandersman and Stojiljkovic 2000). *Pasteurella multocoda* er vist å ha både spesifikke hemoglobin/ heme reseptorer samt reseptorer for både hemoglobin og heme (Bosch et al. 2004). Et naturlig steg videre ble derfor å teste om rognkjeksisolatet RK-9100 kunne utnytte hem, i form av hemin som vekstfaktor.

Oxoid™ X, og XV-faktor disker, som begge inneholdt hemin, gav ikke vekst av RK-9100 ved bruk på TSA. Men diskene viste en økningen i kolonidiameter rundt BAB 1,5% NaCl 5% RBC noe som kunne indikere at hemin kunne ha en positiv effekt. Hemin ble derfor tilsatt TSA 2% NaCl i dosen 20 mM. Hemin er, som nevnt tidligere, den oksiderte formen av heme som er den jernbindende delen av hemoglobinet. Noen bakterier kan utnytte hemin som jernkilde samt

enkelte arter som *Haemophilus influenzae* bruker hemin som porphyrinkilde (Wandersman and Delepeleire 2004). *H. influenzae* tilhører *Pasteurellaceae* og er således beslektet med *Pasteurella* sp.

Hemin ble tilsatt i konsentrasjonen 20 mM som tilsvarer 13 mg/ mL TSA. I litteraturen har hemin blitt brukt i flere ulike konsentrasjoner. *Haemophilus influenza* har vist god vekst ved tilsetning av 100 µg/ mL (Biberstein and Gills 1961) samt ved dyrking av *H. influenza* Type b har en konsentrasjon på 30 µg/mL blitt brukt (An et al. 2015).

Bartonella henselae gav størst vekst ved 0,2 mM hemin i flytende medie, noe som tilsvarer 0,13 mg/ ml (Sander et al. 2000). *B. henselae* er en næringskrevende bakterie som vanligvis dyrkes på medier tilsatt blod (Sander 1998). For at hemin ikke skulle være en begrensende faktor var planen å bruke den samme konsentrasjon som Sander et al. (2000). På grunn av en regnefeil ble konsentrasjonen i mediet 100 ganger høyere, noe som sannsynligvis har påvirket resultatet.

Heme, som er den reduserte formen for hemin, er toksisk i høye doser, mekanismen bak toksisiteten er ukjent (Anzaldi and Skaar 2010). Ulike bakterier har ulik grad av sensitivitet mot heme toksisitet, gram-positive bakterier er ofte mer sensitive enn gram-negative bakterier (Nitzan et al. 1994). Flere bakterier har ulike mekanismer for å forhindre heme toksisitet ved høye nivåer av stoffet i miljøet (Nitzan et al. 1994). For eksempel vil en mutasjon i genet som koder for toleranse for hydrofobe substanser hos *Neisseria meningitidis* gi høyere toleranse for heme. Mekanismene for hvorfor mutasjon gir økt toleranse for heme er ikke kjent (Rasmussen et al. 2005). *Pasteurella multocida* har et homologt gen og innehar sannsynligvis samme mekanisme (Anzaldi and Skaar 2010; Rasmussen et al. 2005). Man kjenner altså ikke til hvordan høye doser av hemin vil påvirke *Pasteurella* sp., men det er stor sannsynlighet for at bakterien blir påvirket negativt. Hemin burde derfor blitt testet på nytt, gjerne i ulike konsentrasjoner mellom 30 µg/mL - 130 µg/mL for å se om rognkjeksisolatene kan utnytte det som jern- eller porphyrinkilde.

For å se om en definert jernkilde kunne gi vekst ble uorganisk jern i form av jern(II)sulfat heptahydrat og jern(III)klorid hexahydrat brukt som tilsetningsstoffer til TSA 1,5% og 2% NaCl. TSB tilsatt jern(III)klorid hexahydrat ble også forsøkt. Som nevnt i avsnitt 2.3.5 er det ikke kjent hvilke former av jern *Pasteurellaceae* kan utnytte. Jern(III)klorid hexahydrat ble brukt som uorganiske jerntilsetninger både i fast og flytende medium.

Litteraturen viste at 2 mM FeCl₃ har blitt brukt som jerntilsetning i Euogon broth for dyrking av marine *Francisella* sp. Tilsetningen ble brukt som et alternativ i flytende medium til 1% hemoglobin i fast medium (Kamaishi et al. 2005) Jern(II)sulfat heptahydrat ble benyttet i samme konsentrasjon, slik at jernnivået ville være det samme i begge tilsetningene. Ved bruk av jern(III)klorid hexahydrat i flytende medium (TSB) ble OD svært ujevn, noe som resulterte i mistanke om utfelling. Det er mulig at holo-transferrin kunne forhindre dette (Sigma-Aldrich 2016) og at kombinasjonen av jern(III)klorid hexahydrat og transferrin i cellekultur er noe som burde vært testet.

Ingen av de uorganiske jernkildene gav vekst for RK-9100. TSA 2% NaCl tilsatt henholdsvis 2 mM jern(III)klorid hexahydrat og 2 mM jern(II)sulfat heptahydrat ble også testet på isolat RK-9758 og AL-2257. RK-9758 viste ikke vekst på mediene, men AL-2257 viste god vekst. AL-2257 viste også god vekst på TSA 2% NaCl alene.

Da det så ut som organisk bundet jern (i form av hemoglobin) var den komponenten som var nødvendig for vekst, ble andre jernkilder i denne formen forsøkt. Transferrin reseptorer har vært funnet hos flere stammer av *Pasteurella multocida* (Ogunnariwo and Schryvers 2001), noe som gav håp om at det kunne også gi vekst av RK-9100. Mekanismene for transferrinopptak hos gram-negative bakterier er ikke fullt ut kartlagt, men baserer seg på at jern(III) ekstraheres fra transferrin før det tas opp av bakteriecellen (Wandersman and Delepelaire 2004). Holo-transferrin ble først forsøkt brukt som jernkilde alene tilsatt TSA i dosene 300 µg/L som anbefalt i Sigma ProductInformation ved tilsetning i cellekultur. En forhøyet dose på 600 µg/L ble også benyttet for at transferrin ikke skulle være en begrensende faktor. Ingen av holo-transferrin konsentrasjonene gav vekst for isolat RK-9100.

Holo-transferrin ble senere tilsatt TSA sammen med henholdsvis jern(III)klorid hexahydrat og jern(II)sulfat heptahydrat, hovedsakelig for å hindre reduksjon av jern(III) (Sigma-Aldrich 2016). Ved bruk av holo-transferrin, sammen med de uorganiske jernkildene, hadde stamløsningen stått i 28 dager. Løsningen er vist stabil i 5-10 dager ved 4°C ifølge Sigma ProductInformation for holo-transferrin fra storfe.

Etter dette er det ikke kjent hva som skjer med løsningen, men det kan ha ført til uønskede nedbrytningsprodukter eller red-oks reaksjoner. Det kan ha påvirket resultatet for isolat RK-9100

som ikke viste vekst på noen av mediene. Forsøket burde vært gjentatt med stamløsning som ble preparert samme dag som mediet ble laget.

Isolat RK-9758 og AL-2257 ble også testet på TSA 2% NaCl tilsatt 2mM jern(III)klorid hexahydrat og 300 µg/L holo-transferrin samt 2 mM jern(II)sulfat heptahydrat og 300 µg/L holo-transferrin. Begge mediene gav vekst for AL-2257. Dette isolatet er tidligere vist å vokse på TSA 2% NaCl, det ble ikke observert endringer i vekst ved bruk av holo-transferrin. Ingen av mediene gav vekst for RK-9758.

Tilsetning av jern(II)sulfat heptahydrat til en løsning fører ofte til at jernet raskt oksideres til jern(III). Askorbinsyre i form av L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR® ble derfor tilsatt begge de uorganiske jerntilsetningene, hovedsakelig for å forhindre oksidering av jern(II)sulfat heptahydrat., men askorbinsyre har også høy evne til å redusere treverdige jern til toverdige jern (Teucher et al. 2004). L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR® ble tilsatt i en konsentrasjon på 4,5 mg/ mL, den samme konsentrasjon som VI, avdeling for medieproduksjon, bruker i produksjon av flytende medium til *Tritrichomonas* sp. Bruk av askorbinsyre i cellekultur sammen med jern er omdiskutert, da askorbinsyre og treverdige jern forårsaker dannelse av hydroksylradikaler, som er ekstremt reaktive frie radikaler som kan skade nukleinsyrer, proteiner og lipider (Inai et al. 2005; Sigma-Aldrich 2016). Dette kan ha påvirket bakteriene negativt i dyrkningsforsøkene. Verken RK-9100, RK-9758 eller AL-2257 vokste på TSA tilsatt jern(III)klorid hexahydrat / jern(II)sulfat heptahydrat og L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR®. Dosen av L(+)-Ascorbic acid AnalaR NORMAPUR® ser ut til å ha vært toksisk for AL-2257, da AL-2257 viste god vekst på de andre komponentene i mediene.

Ved elektroforese av de ulike isolatene kunne man innimellom få uregelmessig antall på båndene, dette kunne skyldes at bakteriesuspensjonen hadde startet å protolysere på grunn av for lang tid fra bakteriesuspensjonen ble preparert til elektroforesen ble gjennomført. Bånd som ble mistenkt å være doble kan relateres til at de ikke har vært fullt redusert før elektroforesen (Anonymous-Cellegro). Uklare bånd kan skyldes for høy proteinkonsentrasjon i bakteriesuspensjonen (Anonymous-Cellegro).

Isolat RK-9100 viste andre egenskaper når den vokste på CHAB, ved at den vokste på lavere salinitet (0,5% salinitet) samt at den ikke vokste i det hele tatt ved CO₂ anriket atmosfære. Bakteriene virket også som nevnt noe tørrere. Ved bruk av SDS-PAGE for å skille de ulike proteinene fra hverandre viste den mye sterkere bånd, spesielt rundt 15 kDa. Dette kan være relatert til at bakteriene dyrket på dette mediet var noe vanskeligere å løse i suspensjon, men det kan også hende at man får en annen proteinuttrykkelse.

Ved dyrking av isolat RK-9100 på TSA tilsatt Soluble Haemoglobin Powder LP0053 + BBL™ IsoVitaleX™ Enrichment, TSA tilsatt Soluble Haemoglobin Powder LP0053 og BA viste bakteriene svært like proteinbånd, som vist på figur 13. Det tyder på at RK-9100 har lik proteinuttrykkelse ved dyrking på blod og hemoglobin. Enkelte brønner har litt flere bånd, noe som kan skyldes at bakteriesuspensjonen har stått litt lenge og at proteinene har startet å protolyser (Anonymous-Cellegro).

Ved sammenligning av alle de seks ulike isolatene gjennom SDS-PAGE så man klare likheter mellom rognkjeksisolatene RK-9100 og RK-9758. Fem proteinbånd skilte dem som vist i tabell 3.4.1. Disse båndene kan skyldes at man har fått en protolysering av proteinene. Generelt var alle båndene ganske svake og man kunne sannsynligvis ha økt bakteriematerialet noe. Flere bånd var like både for rognkjeksisolater og lakseisolater, spesielt gjaldt dette bånd mellom 90-20 kDa. Lakseisolat AL-2257 skilte seg mest fra de andre isolatene grunnet svært få bånd, dette isolatet har også hatt mye bredere næringsbetingelser enn de andre isolatene.

Proteinegenskapene er lite kartlagt hos *Pasteurellacea* generelt samt *Pasteurella* sp. spesielt. (Alarcón et al. 2015b; Kuhnert and Christensen 2008) Det er derfor vanskelig å koble de ulike proteinene til spesielle egenskaper.

Dawit (2015) viste at rognkjeks injisert med *Pasteurella* sp. er vist å danne spesifikke antistoffer mot proteiner på ca. 20 kDa og ca. 100 kDa fra et homogent antigen. Samme antiserum inneholdt antistoffer som kryssreagerte med proteiner på ca. 20 kDa, 37 kDa, 73 kDa og 100 kDa fra et heterogent antigen fra *P. skyensis* (Dawit 2015). Molekylervekten ble estimert etter protokoll fra Bio-Rad (Dawit 2015), ikke ved hjelp av bildebehandlingsprogram. Man kan derfor tenke at man kan få noe variasjon mellom proteinstørrelsene ved bruk av de ulike metodene. Proteinbånd på mellom 80-100 kDa samt 15-20 kDa ble funnet ved elektroforese av RK-9100 på alle

dyrkingsmediene, men båndene på 15 kDa var som sagt noe sterkere ved dyrkning på CHAB. Det kan derfor hende at dyrkning på veldig næringsrike medier gir annen uttrykking av overflateproteiner. Dette er vist for *P. multocida* som uttrykte mer av et protein på 84 kDa og mindre av et protein på 16 kDa, ved dyrking på et jernbegrenset medium (Srivastava 1998).

4.2 Diskusjon av metode

Måling av kolonidiameter ble brukt for å kvantifisere en egenskap på faste medier som kunne si noe om hvordan bakterien trivdes på mediet. Den ble valgt fordi *Pasteurella* sp. fra rognkjeks har krevd blod i mediet for å vokse (Alarcón et al. 2015b; Poppe et al. 2013), noe som gjorde det vanskelig å benytte flytende medier med måling av OD som en metode for å optimalisere veksten. Det var derfor nødvendig å benytte seg av en metode hvor man kunne dyrke bakterien på faste medier og hvor man kunne standardisere arbeidet slik at resultatene kunne sammenlignes.

Måling av kolonidiameter baserer seg på prinsippet om at mikroorganismer deler seg ved binær fisjon (Brock et al. 1984). Teorien bak er at mikroorganismene vil dele seg hurtigere ved optimale enn ved suboptimale vekstvilkår. Dette vil resultere i en større økning i diameter ved måling av de kolonidannede enhetene etter samme tidsperiode. Metoden har tidligere blitt benyttet blant annet for å utvikle modeller for vekst på faste medier (Pirt 1967) og optimalisere dyrkingsmedier for *N. gonorrhoeae* og *N. meningitidis* (Payne and Finkelstein 1977).

Ideelt sett burde man ha brukt samme bakteriesuspensjon for inokulering av alle mediene samtidig, for å minimere mulighetene for bias. Dette var ikke mulig å gjennomføre, da man visste svært lite om *Pasteurella* sp. sine næringsbehov på forhånd. Kartleggingen av disse skjedde derfor gradvis og bygget seg på kunnskapen man tilegnet seg underveis. Dermed valgte man heller å forsøke å standardisere bakteriesuspensjonene ved å bruke en fast OD og fortynning, som vist i tabell 2.3, før man målte koloniens diameter. Det viste seg at selv med standardisert OD og fortynningsrekke gav bakteriesuspensjonene svært ulikt koloniantall, noe som igjen så ut til å påvirke kolonidiameteren. En bakteriesuspensjon med OD: 3, fortynnet til 10^{-5} kunne gi alt fra 30 til 200 cfu. Dette gav stor variasjon i dataene noe som gjorde det vanskelig å få sammenlignbare resultater.

OD måler turbiditet i prøven, opp til et visst nivå vil turbiditeten være proporsjonal med celledettheten. Widdel (2007) mente at denne proporsjonaliteten eksisterer kun ved

$OD \leq ca. 0.4$. I oppgaven hadde bakteriesuspensjonen, som ble brukt til kolonidiametermåling, en OD på 3 før den ble fortynnet til den aktuelle inokuleringsuspensjonen. Men, ODen ble målt ved å fortynne bakteriesuspensjonen i kyvetten (1:9), slik at den målte ODen var på tilnærmet 0.3. Dermed var den under grensen på $OD = 0.4$. Dette tilsier i teorien at celletettheten i suspensjonene burde ha vært tilnærmet lik for de ulike suspensjonen, men koloniantall på skålene viste at den ikke har vært det. Årsaken kan være at celletettheten kan ha vært ujevnt fordelt i suspensjonen.

Mye tyder på at antallet av koloni formende enheter påvirket størrelsen på diameteren. Mindre kolonidiameter kan tyde på at nabokolonier begrenser næringstilgangen til hverandre. Men man kan også få større kolonier ved at nabokolonier fusjonerer eller at koloniene stimulerer hverandres vekst (Breed and Dotterer 1916; Brock et al. 1984). Dette gjenspeilet seg i boksplokkene hvor man kan se at få kolonier på skål gav ofte økte diametere. Kolonidiameter som mål på vekst gjenspeiler altså bare den aktuelle koloniens evne til å utnytte mediet, for å få et fullstendig bilde må man se det i sammenheng med antall cfu på skålen slik at man får et bilde på hvordan en større andel av den aktuelle bakteriepopulasjonen trives.

Ved utsåing av fortynningsrekker fra flytende medier til faste medier ble det benyttet koloniantall som et mål på vekst. Metoden illustrerte da antall levende celler i det flytende mediet som var i stand til å danne koloniformende enheter ved utsåing på det faste mediet. Dette gav en indikasjon på hvor hurtig bakterien delte seg i det flytende mediet og om den delte seg i det hele tatt. En svakhet med metoden er at tellbart antall ikke burde overstige 250 cfu (noe det ofte gjorde), da det lett blir tellefeil ved høyere antall (Tomasiewicz et al. 1980). Man måtte derfor så ut flere fortynninger noe som krevde et stort antall agarskåler. For å illustrere den eventuelle veksten måtte dette gjøres hver dag noe som krevde stor kapasitet i inkubatorskapet. Metoden gav også kun et bilde på hvor stor del av bakteriepopulasjonen som vokste opp, man kunne ikke dokumentere vitenskapelig hvor godt enkeltkoloniene vokste. Metoden var en smule upraktisk da det tok lang tid før man så resultatene, på grunn av ekstra inkubasjonstid på skåler.

Ideelt sett burde rognkjeksisolat RK-9758 blitt dyrket på de samme mediene som isolat RK-9100, for å se om det fantes forskjeller mellom de ulike rognkjeksisolatene. Dyrkningsforsøkene på

blodfraksjoner antydte at det kan finnes forskjeller mellom isolatene, men dette bør undersøkes nærmere for å verifisere om det er reelt.

4.3 Muligheter for vaksinemedium

Som nevnt i kapittel 1.11 bør man etablere et definert dyrkingsmedium for patogener som skal benyttes i vaksineproduksjon. Rognkjeksisolatet RK-9100 viste kun tilfredsstillende vekst ved tilsetning av blod eller hemoglobin fra storfe. Vekstpreferansene, både hva den vokste på og hva den ikke vokste på, indikerer at isolatet har et stort behov for jern. Da jern er en essensiell kofaktor for flere ulike enzymer, er den en vanlig begrensende faktor (Anzaldi and Skaar 2010). Vertsmiljøet har ulike mekanismer for å begrense tilgjengeligheten av jern som nevnt i kapittel 1.10 for å hindre uønsket mikrobiell vekst. Evne til å ta opp jern fra miljøet har derfor en sterk sammenheng med bakteriens evne til å overleve og vokse i verten, og dermed også dens virulente egenskaper (Payne 1993; Ratledge and Dover 2000; Weinberg 1993). Hvilke metoder *Pasteurella* sp. benytter for opptak av jern er ikke kjent. En kartlegging av disse vil være nyttig da jernreseptorer ofte er overflateproteiner som gir antistoffrespons hos verten. Dette er vist for blant annet *Pasteurella haemolytica* og *Pasteurella multocida* (Gilmour et al. 1991; Srivastava 1998). Injisering av disse antigenene kan dermed gi en spesifikk immunrespons som kan stimuleres gjennom vaksinerings.

Å finne en eller flere definerte komponenter som gir uttrykk av disse antigenene kan være nødvendig for å utvikle en suksessfull vaksine mot *Pasteurella* sp. for rognkjeks.

5. Konklusjon

Den viktigste konklusjonen man kan trekke fra oppgaven er at *Pasteurella* sp. har et behov for jern og salt for å vokse. Man har ikke etablert et medium som kan være aktuelt å bruke i vaksineproduksjon, da de eneste komponentene som gav tilfredsstillende vekst av RK-9100 var blod og hemoglobin fra storfe.

RK-9100 endrer også vekstbetingelser ved dyrking på svært næringsrike medier, dette bør undersøkes nærmere da det kan ha noe å si for hvilke antigener man får uttrykt.

Man har også sett noe variasjon mellom isolatene, dette bør undersøkes nærmere for rognkjeksisolatene for å se om det kan ha noe å si i en vaksinesammenheng.

6. Litteraturliste

- Acton, RT, et al. (1971), 'Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 68 (1), 107-11.
- Afshar, M, et al. (2012), 'A study on Haemophilus influenzae type b growth rate and capsule production in different media', *Archives of Razi*, 67 (1), 7-12.
- Alarcón, M, et al. (2015a), 'Co - infection of Nucleospora cyclopteri (Microsporidia) and Kudoa islandica (Myxozoa) in farmed lumpfish, Cyclopterus lumpus L., in Norway: a case report', *Journal of fish diseases*.
- Alarcón, M, et al. (2015b), 'Pasteurellosis in lumpsucker Cyclopterus lumpus, farmed in Norway', *Journal of fish diseases*.
- Alexander, JB and Ingram, GA (1992), 'Noncellular nonspecific defence mechanisms of fish', *Annual Review of Fish Diseases*, 2, 249-79.
- An, SJ, et al. (2015), 'Preparation and testing of a Haemophilus influenzae Type b/Hepatitis B surface antigen conjugate vaccine', *Vaccine*, 33 (13), 1614-19.
- Andrews, SC, Robinson, AK, and Rodríguez-Quiñones, F (2003), 'Bacterial iron homeostasis', *FEMS microbiology reviews*, 27 (2-3), 215-37.
- Anonymous-Cellegro '<http://cellgro.com/media/upload/file/techinfosheets/new/Troubleshooting-Protein%20Electrophoresis.pdf>'.
- Anonymous-Ilaks.
- Anonymous-Nofima '<http://nofima.no/nyhet/2015/01/rognkjeks-kan-vaere-reservoar-for-ipn-virus/>'.
- Anonymous-VI '<http://www.vetinst.no/Nyheter/Viral-hemoragisk-septikemi-virus-paavist-for-foerste-gang-paa-Island>'.
- Anzaldi, LL and Skaar, EP (2010), 'Overcoming the heme paradox: heme toxicity and tolerance in bacterial pathogens', *Infection and immunity*, 78 (12), 4977-89.
- Asplin, L, Boxaspen, KK, and Sandvik, AD (2011), 'Modeling the distribution and abundance of planktonic larval stages of Lepeophtheirus salmonis in Norway', *Salmon Lice: An integrated approach to understanding parasite abundance and distribution*, 29-50.
- Bakketeig, IE, et al. (2016), 'Havforskningsrapporten 2016', *Fisken og Havet*, særnr. 1-2016, 157-58.
- Biberstein, EL and Gills, M (1961), 'Catalase activity of Haemophilus species grown with graded amounts of hemin', *Journal of bacteriology*, 81 (3), 380.
- Birkbeck, TH, et al. (2002), 'Pasteurella skyensis sp. nov., isolated from Atlantic salmon (Salmo salar L.)', *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 52 (3), 699-704.
- Birkbeck, TH, et al. (2004), 'Growth of Piscirickettsia salmonis to high titers in insect tissue culture cells', *Infection and immunity*, 72 (6), 3693-94.
- Bjørn, PA and Finstad, B (1998), 'The development of salmon lice (Lepeophtheirus salmonis) on artificially infected post smolts of sea trout (Salmo trutta)', *Canadian Journal of Zoology*, 76 (5), 970-77.
- Bornø, G and Linaker, (red) (2015), 'Fiskehelse rapporten 2014', (Harstad: Vetrinærinstituttet), 35-37.
- Bornø, G, et al. (2016), 'Akutt dødelighet hos rognkjeks (Cyclopterus lumpus) i 2015', *Vetrinærinstituttets rapportserie 2*.
- Bosch, M, et al. (2004), 'Pasteurella multocida contains multiple immunogenic haemin-and haemoglobin-binding proteins', *Veterinary microbiology*, 99 (2), 103-12.
- Boshra, H, Li, J, and Sunyer, JO (2006), 'Recent advances on the complement system of teleost fish', *Fish & shellfish immunology*, 20 (2), 239-62.
- Breed, RS and Dotterer, WD (1916), 'The number of colonies allowable on satisfactory agar plates', *Journal of Bacteriology*, 1 (3), 321.
- Brock, TD, Smith, DW, and Madigan, MT (1984), *Biology of microorganisms* (New Jersey: Prentice-Hall).

- Bruno, DW, Noguera, PA, and Poppe, T (2013), *A Colour Atlas of Salmonid Diseases Second Edition* (Springer).
- Cox, P and Anderson, M (1922), 'No. 1: A study of the lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.)', *Contributions to Canadian Biology and Fisheries*, 1 (1), 1-20.
- Dale, OB, et al. (2009), 'Outbreak of viral haemorrhagic septicaemia (VHS) in seawater-farmed rainbow trout in Norway caused by VHS virus Genotype III', *Diseases of aquatic organisms*, 85 (2), 93.
- Danilova, N, et al. (2005), 'The immunoglobulin heavy-chain locus in zebrafish: identification and expression of a previously unknown isotype, immunoglobulin Z', *Nature immunology*, 6 (3), 295-302.
- Davenport, J (1985), *Synopsis of biological data on the lumpsucker, Cyclopterus lumpus (Linnaeus, 1758)* (Food & Agriculture Org.).
- Davenport, J and Kjørsvik, E (1986), 'Buoyancy in the lumpsucker *Cyclopterus lumpus*', *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66 (01), 159-74.
- Dawit, BG (2015), 'Adaptive Humoral Immune Response in Lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L'.
- De Mattos, MJ, et al. (1984), 'Influence of metabolic end-products on the growth efficiency of *Klebsiella aerogenes* in anaerobic chemostat culture', *Antonie van Leeuwenhoek*, 50 (5-6), 461-72.
- Dixon, NM and Kell, DB (1989), 'The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro - organisms', *Journal of Applied Bacteriology*, 67 (2), 109-36.
- Dulčić, Jakov and Golani, D (2006), 'First record of *Cyclopterus lumpus* L., 1758 (Osteichthyes: Cyclopteridae) in the Mediterranean Sea', *Journal of fish biology*, 69 (1), 300-03.
- Fadum, E (2000), 'Mulige uønskede miljøeffekter ved bruk av ulike lakselusmidler', *Terapianbefaling: Behandling mot lakselus i oppdrettsanlegg*, 19-21.
- Fast, MD, et al. (2006), 'The effects of *Lepeophtheirus salmonis* infections on the stress response and immunological status of Atlantic salmon (*Salmo salar*)', *Fish & Shellfish Immunology*, 21 (3), 228-41.
- Fiskeridirektoratet *Salg av oppdrettet rensefisk 2012-2014*.
- Foyle, L, et al. (2003), 'Pasteurellosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: immunohistochemistry of the naturally - occurring disease', *Journal of fish diseases*, 26 (6), 373-76.
- Gill, CO and Tan, KH (1979), 'Effect of carbon dioxide on growth of *Pseudomonas fluorescens*', *Applied and Environmental Microbiology*, 38 (2), 237-40.
- (1980), 'Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria', *Applied and Environmental Microbiology*, 39 (2), 317-19.
- Gilmour, NJL, et al. (1991), 'Vaccine containing iron-regulated proteins of *Pasteurella haemolytica* A2 enhances protection against experimental pasteurellosis in lambs', *Vaccine*, 9 (2), 137-40.
- Gomme, PT, McCann, KB, and Bertolini, J (2005), 'Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions', *Drug discovery today*, 10 (4), 267-73.
- Goulet, Denis, Green, John M, and Shears, Tim H (1986), 'Courtship, spawning, and parental care behavior of the lumpfish, *Cyclopterus lumpus* L., in Newfoundland', *Canadian journal of zoology*, 64 (6), 1320-25.
- Grant, AN (2002), 'Medicines for sea lice', *Pest management science*, 58 (6), 521-27.
- Grøntvedt, RN, et al. (2014), 'The surveillance programme for resistance to chemotherapeutants in salmon lice (*Lepeophtheirus salmonis*)', (Oslo: Norwegian Veterinary Institute).
- Gudding (2010), *Vaksinasjon av dyr* (Oslo: Scandinavian Veterinary Press).
- Gudding and Reitan, LJ (2010), *Vaksinasjon av dyr*, eds LJ Reitan and R Gudding (Produksjon, kontroll og dokumentasjon; Oslo: Scandinavian Veterinary Press).
- Gudding, Lillehaug, A, and Evensen, Ø (1999), 'Recent developments in fish vaccinology', *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72 (1), 203-12.

- Gulla, S, et al. (2015), 'vapA (A - layer) typing differentiates *Aeromonas salmonicida* subspecies and identifies a number of previously undescribed subtypes', *Journal of fish diseases*.
- Hamre, LA, et al. (2013), 'The salmon louse *Lepeophtheirus salmonis* (Copepoda: Caligidae) life cycle has only two chalimus stages'.
- Hansen, JD, Landis, ED, and Phillips, RB (2005), 'Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (19), 6919-24.
- Hastefnl, T, Guo'ding, R, and Eve-risen, B (2005), 'Bacterial Vaccines for Fish—An Update', *Dev Biol. Basel*, 121, 55-T4r.
- Haugarvoll, E, et al. (2008), 'Identification and characterization of a novel intraepithelial lymphoid tissue in the gills of Atlantic salmon', *Journal of Anatomy*, 213 (2), 202-09.
- Haugland, GT, et al. (2016), 'Lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) develop amoebic gill disease (AGD) after experimental challenge with *Paramoeba perurans* and can transfer amoebae to Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)', *Aquaculture*.
- Haugland, GT, et al. (2012), 'Phagocytosis and respiratory burst activity in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus* L.) leucocytes analysed by flow cytometry', *PLoS one*, 7 (10), e47909.
- Heuch, PA, Nordhagen, JR, and Schram, TA (2000), 'Egg production in the salmon louse [*Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer)] in relation to origin and water temperature', *Aquaculture Research*, 31 (11), 805-14.
- Heuch, PA, et al. (2002), 'Salinity and temperature effects on sea lice over-wintering on sea trout (*Salmo trutta*) in coastal areas of the Skagerrak', *Journal of the Marine Biological Association of the UK*, 82 (05), 887-92.
- Heuch, PA, et al. (2005), 'A review of the Norwegian 'National Action Plan Against Salmon Lice on Salmonids': the effect on wild salmonids', *Aquaculture*, 246 (1), 79-92.
- Hjeltnes, B, et al. (2016), 'Fiskehelse rapporten 2015', (Veterinærinstituttet).
- Holst, JC (1993), 'Observations on the distribution of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*, L.) in the Norwegian Sea', *Fisheries research*, 17 (3), 369-72.
- Huebers, HA and Finch, CA (1987), 'The physiology of transferrin and transferrin receptors', *Physiological Reviews*, 67 (2), 520-82.
- Imsland, AK, et al. (2014), 'Assessment of growth and sea lice infection levels in Atlantic salmon stocked in small-scale cages with lumpfish', *Aquaculture*, 433, 137-42.
- Inai, Y, et al. (2005), 'Enhanced oxidative stress by L-ascorbic acid within cells challenged by hydrogen peroxide', *Journal of nutritional science and vitaminology*, 51 (6), 398-405.
- Jansen, PA, et al. (2012), 'Sea lice as a density-dependent constraint to salmonid farming', *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 279 (1737), 2330-38.
- Jensen, Frank B, Fago, A, and Weber, RE (1998), 'Hemoglobin structure and function', *Fish physiology*, 17, 1-40.
- Johansen (2013), 'Fiskehelse rapporten 2012', (Oslo: Veterinærinstituttet).
- Johansen, et al. (2016), 'Analyse av sykdomsrelatert risiko forbundet med bruk av villfanget og oppdrettet renseskjold for kontroll av lakselus', (Nofima).
- Jones, MW and Cox, D (1999), 'Clinical disease in sea farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) associated with a member of the family Pasteurellaceae—a case history', *BULLETIN-EUROPEAN ASSOCIATION OF FISH PATHOLOGISTS*, 19, 75-78.
- Kamaishi, T, et al. (2005), 'Identification and pathogenicity of intracellular *Francisella* bacterium in three-line grunt *Parapristipoma trilineatum*', *Fish Pathology*, 40 (2), 67-71.
- Karlsbakk, E, Nylund, A, and Nilsen, F (2014a), 'Kompendium: Fiskeparasitter. Innføring i parasitter hos fisk med vekt på nordiske forhold og akvakultur', 199-229.

- Karlsbakk, E, Nylund, A, and Nilsen, F (2014b), *Fiskeparasitter (Lepeophtheirus salmonis)*: Universitetet i Bergen, Institutt for Biologi).
- Karlsbakk, E, et al. (2014c), 'Sykdom og parasitter i vill og oppdrettet rognkjeks', *Fisken og Havet*, 1, 37-39.
- Korczak, B, et al. (2004), 'Phylogeny of the family Pasteurellaceae based on rpoB sequences', *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54 (4), 1393-99.
- Krieg, N (2007), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, eds G. M. Garrity, J. A. Bell, and Timothy Lilburn (Order XIV Pasteurellales).
- Kuhnert, P and Christensen, H (2008), *Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects* (Horizon Scientific Press).
- Lein, I and Jonassen, TM (2016), 'Sammenstilling av seks produksjonsanlegg for Rognkjeks, 2015', (Akvaplan-niva og Nofima).
- Magnadóttir, B (2006), 'Innate immunity of fish (overview)', *Fish & shellfish immunology*, 20 (2), 137-51.
- Mecklenburg, CW and Sheiko, BA (2003), 'Family Cyclopteridae Bonaparte 1831—lumpsuckers', *Calif Acad Sci Annot Checkl Fish*, 6.
- Midtlyng, PJ and Lillehaug, A (1998), 'Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants', *Diseases of Aquatic Organisms*, 32 (2), 91-97.
- Midtlyng, PJ, Reitan, LJ, and Speilberg, L (1996), 'Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) against furunculosis', *Fish & Shellfish Immunology*, 6 (5), 335-50.
- Munro, ES, et al. (2015), 'A mortality event in wrasse species (Labridae) associated with the presence of viral haemorrhagic septicaemia virus', *Journal of fish diseases*, 38 (4), 335-41.
- Murphy, K (2012a), *Janeway's Immunobiology* (Dynamics of Adaptive Immunity; Abingdon/ New York Garland Science).
- (2012b), *Janeway's immunobiology* (Principles of innate and adaptive immunity; London, New York: Garland Science).
- Muus, BJ (1969), 'Våre saltvannsfisker og fiskerier i Nord europa', (Mortensen, Oslo).
- Nilsen, A, et al. (2014), 'Rensefiskhelse - kartlegging av dødelighet og dødelighetsårsaker', *Veterinærinstituttets rapportserie* (12; Oslo: Vetrinærinstituttet).
- Nitzan, Y, Wexler, HM, and Finegold, SM (1994), 'Inactivation of anaerobic bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin', *Current microbiology*, 29 (3), 125-31.
- NORM-VET (2015), ' Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway (2014)', (Oslo/ Tromsø), 17.
- Ogunnariwo, JA and Schryvers, AB (2001), 'Characterization of a novel transferrin receptor in bovine strains of *Pasteurella multocida*', *Journal of bacteriology*, 183 (3), 890-96.
- Payne, SM (1993), 'Iron acquisition in microbial pathogenesis', *Trends in microbiology*, 1 (2), 66-69.
- Payne, SM and Finkelstein, RA (1977), 'Imferon agar: improved medium for isolation of pathogenic *Neisseria*', *Journal of clinical microbiology*, 6 (3), 293-97.
- Pethon, P and Nyström, BO (1998), *Aschehougs store fiskebok: Norges fisker i farger* ([Oslo]: Aschehoug) 447 s. ill.
- Pike, AW (1989), 'Sea lice—major pathogens of farmed Atlantic salmon', *Parasitology Today*, 5 (9), 291-97.
- Pirt, SJ (1967), 'A kinetic study of the mode of growth of surface colonies of bacteria and fungi', *Microbiology*, 47 (2), 181-97.
- Plant, KP and LaPatra, SE (2011), 'Advances in fish vaccine delivery', *Developmental & Comparative Immunology*, 35 (12), 1256-62.
- Poppe, TT, et al. (2013), 'Rognkjeks i oppdrett - diagnostiske og dyrevelferdsmessige utfordringer ', *Norsk Vetrinær Tidsskrift*, 9 (125), 556-58.

- Rasmussen, AW, et al. (2005), 'Resistance of Neisseria meningitidis to the toxic effects of heme iron and other hydrophobic agents requires expression of ght', *Journal of bacteriology*, 187 (15), 5214-23.
- Ratledge, C and Dover, LG (2000), 'Iron metabolism in pathogenic bacteria', *Annual reviews in microbiology*, 54 (1), 881-941.
- Reid, HI and Birkbeck, TH (2015), 'Characterization of two groups of Pasteurella skyensis isolates from Atlantic salmon, Salmo salar L., based on serotype and 16S rRNA and rpoB gene partial sequences', *Journal of fish diseases*, 38 (4), 405-08.
- rev.3, EMA/410/01 (2011), 'Note for guidance on minimising the risk of transmitting animal spongiform encephalopathy agents via human and veterinary medicinal products '.
- Rye, M, Gjerde, B, and Gjedrem, T (2010), 'Genetic improvement programs for aquaculture species in developed countries', *Proceedings of the 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Leipzig, Germany* (17).
- Rønneseth, A, et al. (2015), 'Functional characterization of IgM+ B cells and adaptive immunity in lumpfish (Cyclopterus lumpus L.)', *Developmental & Comparative Immunology*, 52 (2), 132-43.
- Salama, NKG, et al. (2013), 'Development and assessment of a biophysical dispersal model for sea lice', *Journal of fish diseases*, 36 (3), 323-37.
- Sander, A (1998), 'Microbiological diagnosis of Bartonella species and Afipia felis'.
- Sander, A, et al. (2000), 'Hemin-dependent growth and hemin binding of Bartonella henselae', *FEMS microbiology letters*, 189 (1), 55-59.
- Saurabh, S and Sahoo, PK (2008), 'Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system', *Aquaculture Research*, 39 (3), 223-39.
- Schram, T, et al. (1998), 'Seasonal occurrence of Lepeophtheirus salmonis and Caligus elongatus (Copepoda: Caligidae) on sea trout (Salmo trutta), off southern Norway', *ICES Journal of Marine Science*, 55 (2), 163-75.
- Sigma-Aldrich, Anonymous - (2016), 'Iron in Cell Culture', 12.05.16.
- Singh, S, et al. (2013), 'Axenic culture of fastidious and intracellular bacteria', *Trends in microbiology*, 21 (2), 92-99.
- Sivertsvik, M, Rosnes, JT, and Bergslien, H (2002), 'Modified atmosphere packaging', *Minimal processing technologies in the food industry*, 61-86.
- Snow, M, et al. (1999), 'Analysis of the nucleoprotein gene identifies distinct lineages of viral haemorrhagic septicaemia virus within the European marine environment', *Virus Research*, 63 (1), 35-44.
- Snow, M, et al. (2004), 'Genetic population structure of marine viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV)', *Diseases of Aquatic Organisms*, 61, 11-21.
- Sommerset, I, et al. (2014), 'Vaccines for fish in aquaculture', *Expert review of vaccines*.
- Srivastava, SK (1998), 'Immunogenicity of Pasteurella multocida grown in iron-restricted medium', *Journal of Applied Animal Research*, 13 (1-2), 137-44.
- Stien, L, et al. (2015), 'Risikovurdering Norsk fiskeoppdrett', *Fisken og havet* (2: Havforskningsinstituttet), 157-64.
- Sundnes, HM (2016), 'Rensefisknæringen: Status og veien videre ', *Norsk Fiskerinæring*, 1, 96-105.
- Sunnanå, K (2009), 'Rognkjeks og rognkall', (vol).
- Tadiso, TM, et al. (2011), 'Gene expression analyses of immune responses in Atlantic salmon during early stages of infection by salmon louse (Lepeophtheirus salmonis) revealed bi-phasic responses coinciding with the copepod-chalimus transition', *Bmc Genomics*, 12 (1), 1.
- Taranger, GL, et al. (2012), 'Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2012', *Fisken og Havet*, 2.

- Tebbutt, GM (1983), 'Evaluation of some methods for the laboratory identification of *Haemophilus influenzae*', *Journal of clinical pathology*, 36 (9), 991-95.
- Teucher, Olivares, and Cori (2004), 'Enhancers of iron absorption: ascorbic acid and other organic acids', *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 74 (6), 403-19.
- Thorstad, EB, et al. (2016), 'Marine life of the sea trout', *Marine Biology*, 163 (3), 1-19.
- Tomasiewicz, DM, et al. (1980), 'The most suitable number of colonies on plates for counting', *Journal of Food Protection*®, 43 (4), 282-86.
- Torrissen, O, et al. (2013), 'Salmon lice—impact on wild salmonids and salmon aquaculture', *Journal of Fish Diseases*, 36 (3), 171-94.
- Uribe, C, et al. (2011), 'Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review', *Veterinarni Medicina*, 56 (10), 486-503.
- Valheim, M, et al. (2000), 'Varracalbmi: a new bacterial panophthalmitis in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L', *Journal of Fish Diseases*, 23 (1), 61-70.
- Vasconcelos, P, et al. (2004), 'First record of the lumpfish (*Cyclopterus lumpus* Linnaeus, 1758) off the Algarve coast (southern Portugal): southward extension of the species distributional range', *Journal of Applied Ichthyology*, 20 (2), 159-60.
- Vastine, DW, et al. (1974), 'Comparison of media for the isolation of *Haemophilus* species from cases of seasonal conjunctivitis associated with severe endemic trachoma', *Applied microbiology*, 28 (4), 688-90.
- Wandersman, C and Stojiljkovic, I (2000), 'Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores', *Current Opinion in Microbiology*, 3 (2), 215-20.
- Wandersman, C and Delepelaire, P (2004), 'Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores', *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 611-47.
- Weinberg, ED (1993), 'The development of awareness of iron-withholding defense', *Perspectives in biology and medicine*, 36 (2), 215-21.
- Widdel, F (2007), 'Theory and measurement of bacterial growth', *Grundpraktikum Mikrobiologie*, 4 (11).
- Wilson, M, et al. (1997), 'A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (9), 4593-97.
- Zapata, A, et al. (2006), 'Ontogeny of the immune system of fish', *Fish & shellfish immunology*, 20 (2), 126-36.

Appendix I

Appendix I inneholder grovdata fra vekstforsøk på faste medier. Bakteriekolonienes diameter er målt ved hjelp av stereomikroskop av typen Leica M205 C og bildebehandlingsprogrammet Leica Application Suite Interactive Measurement 4.4.0.

Tabell A1: Isolat 9100, grovdata for tabell 3.1.2.. Kolonidiameteren vises i mm. Kolonner merket med «RBC» og «plasma» viser kolonier som er dyrket på BAB 1,5% NaCl 5% RBC/ 5% plasma. Kolonner merket med «1,5% NaCl» og «2% NaCl» viser kolonier som er dyrket på BA med salinitet som skrevet. OD for suspensjon 1,5% NaCl: 3,002 , OD for suspensjon 2% NaCl: 2,940

Luft:								CO2							
RBC:	RBC:	Plasma:	1,5% NaCl	1,5% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	RBC:	RBC:	Plasma:	1,5% NaCl	1,5% NaCl	2% NaCl	2% NaCl		
1,07	1,311	2,676	0,794	1,341	0,978	1,291	0,711	0,311	1,531	1,324	1,015	0,928	0,98		
1,498	1,223	2,57	1,162	1,266	1,225	1,304	0,613	0,245	1 CFU	1,206	1,032	1,037	0,999		
1,179	1,403		1,054	1,443	1,301	1,254	0,507	0,252		1,171	0,962	1,015	1,102		
0,96	0,868		1,121	1,344	1,949	1,143	3 CFU	3 CFU		1,141	1,263	1,072	1,151		
1,085	CFU: 4		1,092	1,369	0,933	1,269				1,019	1,13	0,921	0,942		
			1,122	1,239	0,764	1,154				1,311	1,085	0,81	1,169		
CFU: 6 stk			0,904	1,377	1,25	1,355				0,531	0,956	0,901	1,196		
			1,258	1,311	1,174	1,188				1,047	1,124	0,703	1,145		
			1,141	1,15	1,052	1,284				1,217	0,863	0,99	0,804		
			1,067	1,171	1,121	1,376				1,259	0,753	0,712	1,07		
			1,179	1,316	1,01	1,217				1,033	0,978	0,744	0,869		
			1,154	1,383	1,265	1,119				1,342	1,017	0,569	1,155		
			1,016	1,341	0,978	1,091				1,21	1,069	0,624	0,842		
			1,019	1,274	1,03	1,292				1,362	1,097	0,7	0,978		
			1,004	1,426	0,889	1,116				0,851	1,623	1,072	1,044		
			1,171	1,208	1,219	0,86				2,211	1,027	0,947	1,156		
			1,143	1,002	1,435	1,189				1	0,944	0,7	0,767		
			1,097	1,17	0,908	1,285				0,978	1,127	0,919	1,082		
			2,044	1,263	0,931	1,274				0,968	0,996	0,974	1,38		
			1,181	1,331	1,078	1,183				1,324	1	0,691	1,041		
			1,202	1,08	1,254	1,218				0,814	1,06	0,997	1,033		
			1,2	1,163	1,232	1,166				1,95	0,844	0,722	1,178		
			0,813	1,287	1,162	1,274				1,259	CFU: 22	1	0,954		
			1,107	1,192	1,183	1,179				0,814		1,083	1,104		
			0,905	1,393	1,199	1,244				1,255		0,622	0,937		
			1,087	1,515	0,913	0,972				1,158		0,789	1,041		
			1,294	1,332	1,231	1,235				1,305		1,034	1,095		
			0,892	0,998	1,094	CFU: 27				1,377		0,871	1,104		
			1,094	1,344	1,2					1,318		0,888	CFU: 29		
			1,235	1,356	0,906					0,904		1,529			
			1,331	1,287	0,929					0,984		1,118			
			31 CFU	1,323	0,958					1,282		0,966			
				1,057	1,2					1,327		1,081			
				1,094	1,324					0,785		1,244			
				1,121	1,285					1,214		1,182			
				1,121	1,092					CFU: 35		1,029			
				1,052	1,133							1,16			
			36 CFU	1,215								1,008			
				1,221								0,897			
				CFU: 38								1,102			
												CFU: 40			

Tabell A2: Grovdata for tabell 3.1.3, isolat 9100. Kolonidiameteren vises i mm. Kolonnene er merket med mediet de er dyrket på. Kolonner merket med «1,5% NaCl» og «2% NaCl» viser kolonier som er dyrket på BA med salinitet som skrevet. OD for suspensjon: 0,5% NaCl: 2,943 1,5% NaCl: 3,115 , OD for suspensjon 2% NaCl: 2,825

Luft:						CO2					
1,5% NaCl	1,5% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	Chab	Chab	1,5% NaCl	1,5% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	Chab	Chab
0,62	0,988	0,727	0,67	0,464	0,562	0,686	0,817	0,669	0,542	0 cfu	0 cfu
1,46	1,592	0,647	0,555	0,561	0,581	0,73	0,839	0,628	0,687		
0,708	0,952	0,602	0,669	0,361	0,567	0,742	0,893	0,614	0,665		
0,911	0,987	0,78	0,628	0,523	0,443	0,635	0,841	0,691	0,513		
0,995	1,379	0,585	0,62	0,514	0,624	0,742	0,824	0,523	0,671		
0,954	0,9	0,479	0,563	0,453	0,487	0,715	0,698	0,626	0,526		
0,862	0,691	0,57	0,631	0,398	0,457	0,818	0,803	0,526	0,626		
0,846	0,699	0,499	0,544	0,526	0,513	0,658	1,281	0,671	0,523		
1,332	0,936	0,68	0,493	0,401	0,561	0,668	0,884	0,619	0,691		
1,013	0,97	0,561	0,615	0,437	0,476	0,761	0,818	0,474	0,614		
1,022	0,791	0,677	0,591	0,541	0,453	0,805	0,842	0,486	0,628		
0,754	1,079	0,757	0,591	0,368	0,429	0,86	0,835	0,626	0,669		
0,938	0,943	0,736	0,502	0,465	0,527	0,876	0,779	0,624	0,528		
0,884	1,097	0,658	0,722	0,304	0,592	0,787	0,714	0,727	0,608		
0,98	1,007	0,848	0,681	0,374	0,546	0,839	0,785	0,607	0,574		
0,993	0,976	0,792	0,542	0,433	0,457	0,83	0,621	0,741	0,574		
1,107	0,912	0,685	0,547	0,478	0,554	0,805	0,678	0,768	0,534		
1,102	0,82	0,913	0,508	0,319	0,462	1,19	0,629	0,637	0,426		
1,087	0,866	0,817	0,62	0,368	0,573	0,852	0,713	0,639	0,582		
0,985	0,763	0,803	0,589	0,373	0,547	0,619	0,822	0,562	0,66		
0,971	0,801	0,684	0,568	0,486	0,578	0,732	0,839	0,465	0,672		
1,132	0,999	0,722	0,414	0,464	0,493	0,868	0,631	0,54	0,656		
1,109	0,981	0,762	0,642	0,388	0,583	0,762	0,654	0,603	0,7		
1,057	0,992	0,596	0,507	0,342	0,491	0,821	0,712	0,7	0,54		
1,109	1,126	0,792	0,404	0,436	0,494	0,92	0,714	0,656	0,603		
1,023	0,999	0,763	0,508	0,426	0,319	0,852	0,72	0,672	0,465		
1,002	0,667	0,793	0,509	0,484	0,399	0,673	0,629	0,66	0,562		
1,029	0,851	0,856	0,542	0,458	0,517	0,812	0,648	0,582	0,639		
1,111	0,952	0,831	0,606	0,486	0,464	0,804	0,817	0,426	0,637		
1,055	0,955	0,704	0,379	0,331	0,433	0,74	0,762	0,534	0,741		
1,113	Cfu: 42	0,77	0,581	0,307	0,238	0,936	0,776	0,528	0,786		
1,063		0,398	0,694	0,464	0,381	0,801	1,186	0,574	0,607		
1,024		0,521	0,333	0,402	0,395	0,734	0,677	0,687	0,727		
1,044		0,625	0,577	0,525	0,376	0,621	0,87	0,542	0,624		
1,098		0,501	0,546	0,361	0,471	0,885	0,914	0,665	0,486		
0,952		0,484	0,531	0,396	0,46	0,638	0,648	0,513	0,626		
0,809		0,231	0,568	0,46	0,462	0,901	0,797	0,574	0,619		
0,563		0,651	0,569	0,458	0,413	0,596	0,792	0,608	0,474		
1,496		0,63	0,395	0,495	0,443	0,752	0,925	0,67	0,515		
1,092		0,532	0,526	0,263	0,391	0,739	0,875	0,579	0,543		
1,648		0,596	0,495	0,526	0,601	0,795	0,755	0,433	0,676		
1,137		0,664	0,552	0,402	0,348	0,682	0,684	0,495	0,618		
1,052		0,674	0,585	0,325	0,485	0,947	0,841	0,579	0,595		
0,981		0,639	0,352	0,298	0,63	0,576	Cfu: 42	0,549	0,549		
0,963		0,639	0,442	0,47	0,401	0,57		0,417	0,67		
1,023		0,777	0,526	0,497	0,571	0,505		0,498	0,417		
0,971		0,635	0,573	0,504	0,501	0,446		0,536	0,387		
Cfu: 47		0,77	0,489	0,436	0,61	0,682		0,484	0,461		
		0,629	0,915	0,407	0,339	0,829		0,319	0,457		
		0,699	0,587	0,48	0,589	0,947		0,368	0,446		
		0,454	0,63	0,419	0,473	0,703		0,61	0,61		
		0,73	0,603	0,357	0,487	0,836		0,461	0,498		
		0,699	0,52	0,325	0,457	Cfu: 57		0,387	0,579		
		0,639	0,439	0,418	0,487			0,618	0,48		
		0,438	0,52	0,681	0,466			0,515	0,626		
		0,66	0,735	0,311	0,557			0,543	0,671		
		0,81	0,679	0,334	0,513			0,676	0,597		
		0,568	0,513	0,446	0,516			0,457	0,554		
		0,656	1,074	0,278	0,405			0,446	0,605		
		0,605	0,644	0,42	0,509			0,595	0,464		
		0,517	0,508	0,249	0,592			0,484	0,475		

		0,47	0,555	0,45	0,509			0,47	0,474	
		0,502	0,553	0,341	0,438			0,319	0,459	
		0,574	0,608	0,313	0,505			0,541	0,378	
		0,462	0,55	0,394	0,465			0,399	0,52	
		0,676	0,69	0,341	0,426			0,416	0,405	
		0,623	0,594	0,406	0,529			0,335	0,451	
		0,515	0,288	0,466	0,588			0,486	0,486	
		0,537	0,575	0,356	0,442			0,464	0,541	
		0,551	0,632	0,461	0,692			0,605	0,47	
		0,642	0,454	0,45	0,442			0,475	0,399	
		0,583	0,678	0,407	0,386			0,474	0,416	
		0,635	0,529	0,461	0,54			0,459	0,355	
		0,606	0,712	0,389	0,375			0,378	0,484	
		0,706	0,69	0,422	0,489			0,405	0,536	
		0,652	0,628	0,333	0,442			0,451	0,484	
		0,782	0,712	0,45	0,536			0,52	0,495	
		0,555	0,709	0,284	0,606			0,554	0,582	
		0,606	0,694	0,417	0,575			0,48	0,434	
		0,525	0,636	0,438	0,457			0,626	0,656	
		0,546	0,67	0,419	0,67			0,671	0,679	
		0,668	0,669	0,392	0,638			0,597	0,775	
		0,773	0,751	0,325	0,52			0,582	0,685	
		0,72	0,636	0,48	0,801			0,434	0,693	
		0,637	0,477	0,388	0,493			0,656	0,795	
		0,594	0,412	0,25	0,587			0,679	0,541	
		0,624	0,526	0,346	0,455			0,775	0,699	
		0,55	0,508	0,466	0,583			0,685	0,735	
		0,581	0,496	0,279	0,352			0,693	0,901	
		0,656	0,407	0,388	0,474			0,795	0,68	
		0,656	0,931	0,417	0,538			0,541	0,735	
		0,532	0,66	0,422	0,316			0,699	0,565	
		0,568	0,673	0,389	0,394			0,735	0,582	
		0,568	0,663	0,333	0,473			0,759	0,687	
		0,598	0,616	0,45	0,505			0,756	0,697	
		0,57	0,419	0,461	0,547			0,61	0,618	
		0,568	0,676	0,407	0,405			0,618	0,61	
		0,517	0,931	0,45	0,535			0,697	0,756	
		0,355	0,66	0,461	0,536			0,687	0,759	
		0,519	0,673	0,417	0,52			0,565	0,47	
		0,435	0,663	0,284	0,631			0,582	0,501	
		0,514	0,616	0,438	0,552			0,68	0,661	
		0,515	0,419	0,418	0,49			0,901	0,638	
		0,517	0,676	0,468	0,563			0,591	0,785	
		0,609	0,635	0,44	0,554			0,533	0,685	
		0,594	0,601	0,373	0,583			0,544	0,733	
		0,637	0,595	0,465	0,515			0,478	0,653	
		0,72	0,549	0,485	0,464			0,653	0,526	
		0,592	0,623	0,477	0,483			0,526	0,653	
		0,533	0,686	0,492	0,583			0,733	0,478	
		0,587	0,665	0,387	0,458			0,653	0,544	
		0,525	0,661	0,466	0,508			0,685	0,533	
		0,581	0,638	0,511	0,552			0,714	0,591	
		0,712	0,615	0,428	0,44			0,639	0,639	
		0,753	0,335	0,516	0,498			0,758	0,714	
		0,594	0,61	0,449	0,56			0,638	0,7	
		0,615	0,605	0,431	0,505			0,661	0,587	
		0,571	0,638	0,374	0,493			0,501	0,583	
		0,593	0,508	0,514	0,537			0,47	0,687	
		0,547	0,491	0,506	0,571			0,7	0,593	
		0,46	0,615	0,466	0,583			0,687	0,603	
		0,557	0,602	0,542	0,552			0,593	0,526	
		0,556	0,55	0,359	0,483			0,603	0,647	
		0,67	0,694	0,45	0,571			0,583	0,568	
		0,753	0,638	0,473	0,537			0,587	0,637	
		0,498	0,639	0,341	0,493			0,526	0,591	
		0,427	0,588	0,421	0,505			0,779	0,609	
		0,414	0,508	0,475	0,56			0,747	0,779	
		0,445	0,535	0,417	0,52			0,722	0,747	
		0,533	0,53	0,542	0,41			0,429	0,711	
		0,554	0,439	0,438	0,495			0,77	0,552	
		0,529	0,562	0,451	0,498			0,609	0,467	
		0,596	0,497	0,557	0,44			0,591	0,752	
		0,636	0,625	0,465	0,553			0,647	0,429	
		0,583	0,368	0,361	0,508			0,568	0,722	
		0,428	0,535	0,465	0,458			0,637	0,77	
		0,531	0,535	0,543	0,448			0,711	0,53	
		0,405	0,588	0,455	0,579			0,552	0,509	
		0,423	0,654	0,486	0,347			0,467	0,579	

Tabell A3: Resultat fra kolonidiametermålinger av isolat 2257 fra 28.11.15. Kolonidiameteren vises i mm. Kolonnene er merket med mediet de er dyrket på. Kolonner merket med «1,5% NaCl» og «2% NaCl» viser kolonier som er dyrket på BA med salinitet som skrevet, «plasma» og «RBC» viser BAB 1,5% NaCl tilsatt 5% plasma og 5% RBC. OD for suspensjon: 1,5% NaCl: 3,115 , OD for suspensjon 2% NaCl: 2,825.

Luft:						CO2					
1,5% NaCl	1,5% NaCl	Plasma	Plasma	RBC	RBC	1,5% NaCl	1,5% NaCl	Plasma	Plasma	RBC	RBC
2,426	3,256	3,129	3,299	3,132	2,792	3,126	3,574	3,067	3,077	3,395	3,168
2,411	2,807	3,018	2,544	2,744	2,457	3,222	3,798	3,292	3,318	3,448	3,04
2,506	2,518	3,122	2,108	2,491	2,206	3,09	3,309	3,419	3,172	4,165	2,833
2,602	3,248	2,615	2,767	2,33	2,095	3,232	3,249	2,91	2,956	3,109	2,984
2,97	3,141	2,135	2,751	2,275	2,193	2,899	3,7	3,237	2,7	3,075	2,74
2,781	3,419	2,813	1,855	2,575	2,066	3,042	3,707	2,91	2,91	3,345	2,739
2,438	3,105	2,635	2,682	2,148	1,997	2,653	3,29	2,748	2,92	3,505	2,726
2,872	2,993	2,177	2,571	1,791	1,974	3,129	3,126	2,79	2,914	2,994	2,662
2,834	3,207	2,765	3,357	2,383	2,121	2,584	2,997	2,653	3,102	3,015	2,739
3,028	2,672	3,255	2,844	2,623	2,333	3,477	3,129	3,28	3,226	2,955	2,729
3,165	2,928	2,868	2,96	3,262	1,978	2,926	2,919	2,725	2,67	3,432	2,483
2,958	3,128	2,873	2,042	2,399	2,317	3,247	2,271	2,865	2,754	3,595	2,461
3,047	2,388	2,603	2,291	2,02	2,572	2,91	2,752	2,918	3,216	3,23	2,872
2,897	2,487	3,128	2,775	2,317	2,055	3,133	2,397	2,978	3,016	3,973	2,734
3,024	2,295	2,948	2,929	2,172	1,904	3,115	2,409	2,901	2,57	3,655	3,116
2,798	2,615	2,663	3,353	2,608	2,042	2,974	2,592	2,773	3,333	3,463	2,876
2,658	2,884	2,791	3,178	2,493	2,188	2,828	2,318	2,39	3,489	2,748	2,821
2,089	2,915	2,612	2,768	2,62	2,118	3,308	4,212	3,241	3,347	3,244	2,562
2,451	2,688	2,652	3,009	2,644	2,255	3,236	3,73	2,696	3,724	2,614	2,604
2,617	2,373	2,831	3,007	2,705	2,142	3,357	3,235	2,67	3,947	3,184	2,58
2,473	2,444	2,608	2,423	3,08	2,043	2,263	3,338	3,169	2,85	2,924	2,615
2,346	2,57	2,446	2,242	2,739	2,021	2,434	3,097	3,075	3,219	3,225	2,445
2,669	2,658	2,588	2,647	3,254	2,107	2,699	3,153	2,65	2,759	3,958	2,801
2,244	2,182	2,648	3,224	2,234	2,037	2,599	3,108	2,643	2,496	3,859	2,734
2,265	2,682	3,271	2,745	2,306	1,723	2,845	2,907	1,936	2,696	2,907	3,176
2,442	2,79	3,133	3,26	1,875	2,07	3,062	2,811	2,177	2,206	2,496	2,74
2,498	2,735	3,055	3,029	2,093	2,128	3,239	2,772	2,902	2,485	2,917	2,937
2,596	2,678	3,118	3,055	2,295	2,527	2,027	2,734	3,063	2,663	2,872	3,027
3,141	2,41	2,71	3,396	2,278	2,116	1,823	3,017	3,427	2,834	2,615	3,172
3,283	2,849	2,155	3,107	2,236	2,323	2,545	3,165	2,971	2,905	2,799	2,866
2,813	2,587	2,146	2,512	1,978	2,301	2,321	3,185	3,082	3,142	2,792	2,686
3,289	2,433	2,448	2,432	1,939	2,724	2,513	2,732	2,895	3,039	2,924	2,574
2,556	1,839	2,43	3,135	1,839	2,273	2,4	2,715	2,588	3,513	3,078	2,426
2,361	2,122	2,529	3,279	1,754	2,781	2,269	2,592	3,19	2,305	2,399	2,768
2,602	2,146	2,212	3,393	1,888	2,805	2,369	2,447	3,199	2,562	2,872	2,246
2,289	2,494	2,043	2,713	2,094	2,013	1,786	2,654	3,768	3,151	2,677	2,466
2,512	2,671	2,243	2,936	1,453	2,843	2,235	2,417	3,156	3,31	2,737	2,39
2,696	2,636	2,096	2,704	1,541	2,437	2,029	2,567	2,791	3,162	2,952	2,771
2,415	2,642	2,881	2,677	1,993	2,447	2,124	2,371	2,733	3,515	3,351	3,039
2,644	2,452	3,068	2,725	1,901	2,6	2,446	2,589	3,042	3,344	2,639	3,011
2,439	2,202	2,724	3,156	2,124	2,361	2,379	2,49	2,735	3,045	2,5	2,841
2,6	2,166	2,785	2,532	2,164	2,469	2,504	1,606	2,688	3,568	2,562	2,984
2,65	2,168	3,043	2,404	2,278	1,93	2,17	1,874	2,419	3,382	2,713	3,05
2,081	2,248	2,862	2,377	3,012	2,045	2,18	2,005	2,66	3,398	2,634	2,944
2,107	2,325	2,532	2,762	3,112	1,764	2,322	2,331	2,588	3,314	3,26	2,926
2,364	2,402	2,523	2,377	2,971	1,757	2,135	2,76	2,319	2,796	3,584	2,62
2,414	2,28	2,245	2,89	3,364	1,518	2,201	2,843	2,559	3,715	3,098	2,62
2,207	2,375	2,694	2,71	3,458	1,622	2,202	2,49	2,332	3,037	2,642	2,511
2,004	2,361	2,746	3,093	3,379	1,77	2,402	2,29	2,788	3,189	2,8	2,578
2,496	2,567	2,445	3,099	3,571	1,721	2,576	2,073	2,07	3,043	2,648	2,522
2,596	2,459	2,859	3,386	2,264	1,962	2,473	3,136	2,566	2,831	3,644	2,577
2,43	2,293	2,861	2,716	2,138	2,1	2,201	3,284	2,907	2,559	2,674	2,439
2,264	2,14	2,837	3,218	2,175	2,294	2,014	3,298	2,809	2,559	2,906	2,401
2,716	2,315	3,184	3,092	3,208	2,368	1,984	3,468	2,826	3,399	3,729	2,648
2,568	2,599	3,287	3,357	2,866	2,175	1,896	3,176	3,242	3,623	2,833	2,385
2,506	2,308	2,821	2,829	3,027	2,003	2,35	2,57	2,886	3,889	2,923	2,317
2,232	1,836	2,96	2,686	2,957	1,855	2,342	2,559	2,624	3,633	2,528	2,225
2,319	2,296	2,939	2,517	3,19	1,582	2,079	2,352	2,564	3,434	2,845	2,153
2,442	2,361	2,725	2,568	3,07	2,834	2,269	2,449	2,544	3,564	2,9	2,446
2,671	2,602	3,221	2,355	3,025	2,327	2,371	2,093	2,503	3,334	3,159	2,92
2,665	2,534	3,268	2,777	3,002	2,409	2,886	2,009	cfu: 65	2,563	2,371	3,073
2,726	3,397	2,777	2,886	3,492	2,271	2,964	2,111	2,82581667	2,714	2,14	2,792

2,461	2,825	2,833	1,937	3,524	2,3	3,21	1,971		2,808	2,148	2,906
2,699	3,105	3,112	1,841	2,843	1,989	2,767	1,899		1,758	2,515	3,049
2,559	3,162	2,609	2,343	2,98	2,399	2,36	2,984		2,385	2,178	2,954
2,247	3,113	2,779	2,488	3,821	2,486	2,786	3,226		2,172	2,412	2,867
2,428	2,761	2,493	1,907	4,136	2,834	2,699	3,238		1,864	2,771	3,062
2,117	2,878	2,677	2,252	3,841	2,99	2,641	3,022		1,963	2,218	3,323
2,288	3,088	2,438	2,311	2,412	2,443	2,045	3,27		2,668	3,019	3,436
2,084	3,036	1,879	2,112	2,805	2,53	2,312	2,695		2,661	2,446	2,627
1,991	2,709	1,655	2,371	2,45	2,838	2,019	2,188	Cfu: 87		2,806	2,723
2,008	2,49	2,064	2,646	2,476	2,817	2,5	2,304	2,98942254		2,376	2,108
2,017	2,507	2,519	2,215	2,719	2,462	2,417	2,757			2,32	2,26
1,904	2,593	2,134	2,761	2,827	2,376	2,624	2,135			2,594	2,299
2,225	2,838	2,311	2,874	2,808	2,283	1,985	2,226			2,585	2,63
2,478	2,629	2,321	2,604	2,674	2,365	1,808	2,483			2,262	2,456
2,411	2,682	2,538	2,305	2,363	2,722	2,073	2,111			2,406	2,932
2,411	2,77	2,403	2,598	2,425	2,105	1,579	2,404			2,637	2,523
2,283	2,663	2,653	2,888	2,265	1,656	1,545	2,562			3,126	2,871
2,324	3,088	2,708	2,72	2,783	1,849	1,768	2,163			2,328	2,91
2,396	3,036	2,371	2,66	2,739	1,993	2,088	2,568			2,523	2,589
2,463	2,406	2,08	2,826	2,901	1,865	1,997	1,997			2,163	2,2
2,09	3,009	2,406	2,445	2,604	2,081	1,948	2,186			3,006	2,261
2,19	3,136	2,441	3,227	2,548	2,076	1,705	2,184			2,847	2,464
2,089	3,222	2,637	3,135	2,726	1,969	1,863	2,5			3,035	2,719
2,029	3,272	2,338	3,266	2,754	2,288	1,931	2,417			3,15	2,538
2,157	2,818	2,162	3,254	2,656	1,751	2,494	2,181			3,049	2,771
2,058	2,045	2,51	3,073	2,511	1,737	2,27	2,777			2,911	2,567
2,038	2,243	2,403	3,259	2,556	1,654	2,816	2,671			2,719	2,634
2,317	1,824	2,653	2,894	2,852	1,498	2,968	2,951			2,561	2,826
2,112	1,836	2,708	2,909	2,726	1,531	2,763	2,834			3,245	2,724
2,774	2,014	2,371	2,989	2,838	1,7	2,537	3,019			3,325	2,616
3,085	2,073	2,08	2,444	3,176	1,931	3,04	2,895			2,272	2,616
2,992	1,987	2,406	2,349	3,026	2,398	2,756	2,672			2,657	2,534
3,494	2,08	2,441	2,078	3,155	3,004	3,107	2,833			2,652	2,553
3,549	2,096	2,338	2,658	3,183	2,449	2,754	2,657			2,456	2,344
2,129	2,11	2,637	3,042	3,487	2,408	2,89	1,996			2,318	1,915
2,411	2,172	2,162	2,839	3,283	2,36	2,992	2,31			2,456	2,529
2,265	2,334	2,51	2,94	3,129	2,58	2,906	2,438			2,82	2,618
2,524	2,111	2,584	2,333	2,738	3,119	2,849	2,083			2,65	2,25
2,341	2,048	2,361	2,132	2,876	3,022	3,023	3,102			2,332	2,301
2,226	2,143	3,106	2,341	3,402	3,177	2,57	2,946			2,136	2,123
3,105	2,311	2,176	1,725	3,187	3,233	3,074	3,073			2,664	2,384
3,419	2,355	2,481	1,976	3,233	3,247	2,923	2,881			2,288	2,829
3,141	1,804	2,706	2,529	3,147	3,492	3,225	2,275			2,359	2,253
3,248	2,069	2,905	2,148	2,908	3,271	2,794	2,359			2,245	2,208
2,518	2,109	2,384	2,404	3,162	3,275	3,275	3,161			2,483	2,215
2,807	2,041	2,679	2,38	3,085	2,892	3,17	2,496			2,379	2,294
3,256	2,24	2,845	1,839	2,617	3,282	3,36	2,539			2,514	2,139
3,128	1,898	2,435	2,335	2,368	3,257	2,852	2,694			2,253	2,461
2,928	1,706	2,552	2,583	3,123	2,855	3,01	2,3			3,398	2,516
3,207	1,71	2,289	2,274	2,774	3,076	2,892	2,603			2,613	2,038
2,677	2,104	2,487	2,082	2,758	2,974	3,033	2,251			2,666	2,156
2,993	2,122	2,182	2,549	2,963	3,442	3,306	2,5			3,184	2,114
2,182	1,949	2,766	2,327	2,688	3,095	3,063	2,793			2,341	1,914
2,658	2,086	2,55	2,807	2,602	3,171	3,268	2,521			2,676	2,156
2,57	2,168	2,819	2,027	2,633	3,282	2,719	3,164			3,126	2,141
2,915	2,002	2,752	2,059	2,423	3,138	2,928	1,844			3,72	1,994
2,884	1,854	2,571	2,07	3,184	3,137	2,851	1,848			3,262	1,801
2,615	2,475	2,932	2,172	3,404	3,175	3,008	1,795			2,562	2,081
2,688	2,628	2,614	2,488	4,008	3,385	3,031	2,298			2,43	2,202
2,295	2,448	2,633	2,05	3,942	3,045	2,809	1,926			2,41	2,346
2,444	1,859	2,374	2,14	3,562	2,835	Cfu: 252	2,136			2,56	2,134
2,373	1,721	2,959	2,354	3,347	2,956		2,91			2,131	2,279
2,487	1,717	2,671	2,301	2,923	3,207		2,62			2,947	2,358
2,388	1,781	3,008	2,644	2,98	3,381		2,366			2,614	2,193
Cfu: 213	1,799	2,777	2,763	3,129	3,009		2,159			3,216	2,565
	1,759	2,198	2,524	3,418	3,038		2,418			3,47	2,737
	1,745	2,118	1,609	3,143	3,311		2,244			3,239	2,352
	1,592	2,062	2,724	2,825	2,99		2,339			3,337	2,471
	1,729	2,163	2,957	2,82	3,114		2,519			3,914	2,954
	1,591	2,195	2,818	3,385	2,981		4,165			2,768	2,61
	2,052	2,493	3,011	3,465	3,099		3,448			2,681	2,391
	2,269	2,457	2,177	3,411	3,296		3,395			2,879	2,431
	1,95	2,523	1,624	3,054	3,114	Cfu: 243				3,199	2,331
	2,07	2,369	2,212	3,243	3,067					3,33	2,361
	1,986	2,237	2,379	3,477	3,347					3,14	2,476
	1,946	2,483	2,071	2,608	3,336					3,284	2,414
	1,963	2,168	1,997	2,726	2,547					3,154	2,441
	1,783	2,438	2,617	2,559	2,768				Cfu: 203		2,691
	1,81	2,431	2,144	2,222	2,707				2,86372857		2,954
	1,874	3,083	1,854	2,451	2,752						2,879
	1,804	2,905	2,103	2,407	2,873						3,095
	2,352	2,56	2,199	2,601	2,947						2,891

Tabell A4: Grovdata for tabell 3.1.5 kolonidiametermålinger av isolat 2257.. Kolonidiameteren vises i mm. Kolonnene er merket med saliniteten tilsatt BA som mediene er dyrket på. Kolonner merket med. OD for suspensjon: 0,5% NaCl: 2,912 OD for suspensjon 2% NaCl: 2,798

Luft:				CO2			
0,9% NaCl	0,9% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	2% NaCl	2% NaCl
3,362	4,434	3,227	2,567	3,605	4,228		2,712
3,778	3,48	3,077	2,583	3,887	4,033	2,805	2,773
3,654	3,594	2,906	2,722	3,935	4,122	2,516	2,716
2,909	3,448	2,713	1,943	3,772	4,198	2,171	2,975
2,304	3,663	2,78	2,07	4,327	4,25	2,144	3,169
2,883	3,951	2,614	2,827	3,922	4,092	2,374	2,581
2,909	3,748	2,65	2,445	3,402	4,028	2,552	2,84
3,06	4,284	2,581	3,024	3,686	4,517	2,643	3,12
2,389	4,165	2,698	3,46	3,801	3,296	2,632	3,204
2,562	3,411	2,71	3,106	3,854	3,31	2,43	2,417
2,585	2,954	2,428	3,239	3,906	3,948	2,401	2,513
3,703	3,015	2,942	3,369	4,149	3,377	2,6	2,502
3,126	4,165	2,911	3,113	3,701	3,463	2,354	2,925
2,996	4,284	2,462	2,997	3,3	2,172	2,159	2,458
2,589	3,748	2,482	3,065	3,041	2,887	2,201	2,527
2,763	3,411	3,017	3,455	3,714	3,137	2,454	2,456
2,133	2,954	2,931	3,4	2,706	3,152	2,739	2,35
2,18	3,015	2,584	3,474	2,838	3,383	2,901	1,934
1,775	1,936	2,583	3,117	3,235	3,016	2,966	3,329
2,378	2,185	2,7	3,451	3,034	2,87	2,87	2,852
2,143	2,262	2,577	3,388	3,409	2,955	2,746	3,232
2,248	3,073	2,615	3,539	3,33	2,753	2,647	3,233
2,924	2,542	2,292	3,658	3,611	2,559	3,116	3,549
3,063	2,317	2,115	2,3	3,512	2,347	2,756	3,09
3,595	3,418	2,169	1,914	3,582	2,073	2,889	2,974
3,238	3,517	2,353	3,209	3,5	2,379	3,377	3,236
2,759	3,349	3,106	2,405	3,733	1,993	3,08	2,817
2,759	3,262	3,217	2,288	3,779	2,165	2,603	3,201
2,488	2,673	0,2943	1,893	4,401	2,955	2,662	3,054
2,307	2,907	2,607	2,09	2,09	2,87	2,594	2,663
2,714	3,165	3,034	2,282	1,939	3,016	2,698	2,81
2,733	3,712	3,124	2,526	1,728	3,383	3,098	3,413
2,461	3,249	2,926	2,284	2,098	2,776	3,442	2,59
2,33	3,05	3,376	2,177	1,942	2,591	2,329	2,586
2,505	2,526	2,936	3,362	1,901	2,566	2,297	2,327
2,361	1,911	2,533	3,303	2,192	2,522	1,932	2,362
2,309	2,009	3,351	3,32	2,412	2,733	2,577	1,451
2,243	2,012	2,878	3,562	2,869	2,702	2,169	2,611
2,3	2,516	2,58	3,631	2,657	2,568	2,181	3,29
2,724	2,601	2,498	2,923	2,565	2,595	2,151	2,673
2,382	2,612	2,06	2,244	2,831	2,75	2,224	2,61
2,269	3,128	2,737	2,569	2,447	2,68	2,049	3,066
2,3	3,253	3,573	2,483	2,341	2,56	2,282	2,546
2,831	2,663	1,931	2,347	2,487	2,591	2,15	2,543
2,696	2,557	1,828	2,794	2,208	2,427	2,295	2,224
2,526	3,082	1,774	2,6987	2,392	2,262	2,165	2,357

2,671	2,915	2,159	2,925	2,133	2,725	2,166	1,987
2,5	3,275	2,282	3,166	1,956	2,444	2,311	1,946
2,631	3,176	2,377	3,288	2,52	2,619	2,481	2,288
2,315	3,929	2,309	3,169	2,335	2,728	2,623	2,27
2,248	3,334	3,11	2,85	1,958	2,633	2,788	2,357
2,621	3,188	3,11	2,843	2,083	2,751	2,985	2,291
2,387	3,206	3,349	2,985	2,134	2,666	2,881	2,736
2,346	3,349	2,659	3,306	2,189	2,387	2,25	2,449
2,157	2,724	2,747	3,13	2,412	2,411	2,166	2,357
2,351	2,805	2,422	2,398	2,447	2,399	2,165	2,366
2,406	2,519	1,931	1,908	2,72	2,754	2,311	2,671
2,982	3,257	3,577	1,923	2,409	2,877	3,237	2,911
2,68	3,292	3,357	2,008	2,285	3,25	3,358	2,773
2,809	3,02	3,385	1,98	2,322	2,772	3,445	2,901
2,829	3	3,009	1,865	2,664	2,56	3,467	2,522
3,273	3,213	2,784	1,964	2,53	2,363	2,471	2,045
2,586	3,12	3,039	2,053	2,698	2,057	2,467	2,348
2,573	3,218	2,65	2,195	3,084	2,572	2,052	2,559
2,633	3,55	2,617	2,232	2,488	2,114	2,139	2,279
3,288	2,281	2,83	2,446	2,397	2,255	2,085	2,328
2,913	2,277	2,565	2,397	2,658	2,52	2,298	2,309
2,979	2,335	2,586	2,522	2,72	2,339	1,814	2,738
3,131	2,417	2,569	3,03	2,409	2,425	1,716	2,458
2,307	2,44	3,053	3,005	2,285	2,778	1,56	2,376
2,518	2,644	2,661	3,081	2,322	2,597	2,119	2,277
2,419	2,961	2,661	3,214	2,322	2,92	2,392	2,458
2,891	2,503	2,534	3,737	2,664	2,237	2,911	2,342
2,677	1,667	2,369	3,736	2,53	2,176	2,998	2,175
2,785	2,068	2,484	3,493	2,698	2,258	2,906	Cfu: 139
2,921	2,534	2,622	2,278	3,084	2,192	Cfu: 141	2,62672973
3,47	2,685	2,833	2,692	2,488	2,213	2,5267973	
3,219	4,814	2,511	2,643	2,397	2,824		
3,314	4,636	2,333	2,612	2,658	2,999		
3,624	4,189	3,478	2,566	2,665	2,819		
3,905	4,229	2,842	3,016	2,444	3,37		
4,073	3,78	2,345	3,333	2,122	3,903		
4,375	4,026	3,093	3,816	2,166	3,51		
4,102	3,262	3,224	2,943	2,161	3,708		
4,616	2,585	3,734	3,155	2,083	3,991		
4,441	2,223	2,406	3,316	2,163	2,453		
4,607	2,568	2,554	2,875	2,062	3,105		
3,999	2,233	2,811	3,858	2,544	2,475		
4,072	2,176	2,641	3,567	2,293	2,988		
4,536	2,774	2,764	3,604	2,501	3,245		
3,656	2,237	2,156	3,419	2,252	3,237		
3,217	2,367	2,536	3,8	2,298	2,797		
3,283	2,192	2,961	2,572	2,448	3,232		
3,456	2,374	2,503	2,96	2,518	2,587		
3,373	2,301	2,149	3,052	2,815	2,599		
3,577	1,927	2,121	3,371	2,645	2,576		
3,596	2,308	2,316	3,6488	2,544	2,888		
3,656	2,349	2,082	Cfu: 159	2,68	3,326		
2,491	2,248	2,173	2,87170103	2,774	Cfu: 154		
2,982	2,262	2,295		2,628	2,87626531		
2,379	2,299	2,226		2,893			

2,279	2,209	2,326		2,883		
2,258	3,191	2,197		Cfu: 166		
2,611	3,583	Cfu: 171		2,7570198		
2,246	3,172	2,6536402				
2,416	2,92					
2,21	3,172					
2,651	3,112					
2,449	3,164					
2,795	3,064					
2,661	2,584					
2,469	Cfu: 150					
3,349	2,98494545					
3,874						
4,274						
3,019						
3,054						
3,238						
2,959						
2,825						
3,129						
2,989						
3,736						
Cfu: 143						

Tabell A5: Grovdata, tabell 3.1.6. Isolat 9389 fra 11.02.16. Kolonidiameteren vises i mm. OD: 3,473

Luft:						CO2:					
1,5% nacl	1,5% nacl	Rbc:	RBC:	Plasma:	Plasma:	1,5% nacl	1,5% nacl	RBC:	RBC:	Plasma:	Plasma:
2,527	2,173	2,184	2,374	0,677	0,609	2,148	2,61	1,654	1,46	0,775	0,584
1,996	2,34	2,124	2,13	0,606	0,671	2,242	2,728	1,497	1,654	0,864	0,817
2,292	2,024	2,259	1,929	0,716	0,7	2,201	3,593	1,544	1,505	0,751	0,87
2,694	2,391	2,112	2,535	0,615	0,557	2,298	2,872	1,364	1,535	0,971	0,76
1,81	2,253	1,676	1,792	0,558	0,664	2,125	2,717	1,389	1,561	1,049	0,78
1,563	1,98	2,509	2,047	0,587	0,621	1,716	3,147	1,41	1,238	0,944	0,746
2,12	2,324	1,432	1,625	0,658	0,571	2,082	3,056	1,238	1,201	1,006	0,766
2,665	2,118	1,517	1,654	0,67	Cfu: 7	2,553	3,407	1,286	1,218	1	0,687
1,503	2,218	1,394	1,786	0,661	0,62757143	2,69	3,197	1,196	1,241	0,854	0,73
1,779	2,383	1,528	1,706	0,523		2,279	2,638	1,35	1,297	0,62	0,81
2,295	2,569	1,536	1,687	0,588		2,397	2,63	1,24	1,316	0,678	0,712
2,786	2,554	1,792	1,634	0,661		2,334	2,479	2,006	1,258	0,781	0,87
2,422	2,074	1,505	1,729	0,496		1,442	3,034	2,195	1,822	0,826	Cfu: 17
2,333	2,391	1,477	2,009	0,639		1,73	1,084	1,764	2,116	0,888	0,761
2,385	1,703	1,354	1,529	0,601		1,741	1,028	1,66	1,946	0,958	
1,841	2,517	1,507	1,647	0,615		1,655	1,059	1,58	1,912	0,9	
2,753	1,815	1,767	1,605	Cfu: 16		1,698	1,668	1,297	1,847	0,677	
2,679	2,003	1,365	1,807	0,6169375		2,141	1,1	1,779	1,893	1,032	
1,996	1,848	1,378	1,751			1,921	1,695	1,531	1,577	0,768	
1,64	2,049	1,258	2,051			1,84	2,104	1,404	1,617	0,832	
1,846	1,813	1,244	1,416			1,757	1,821	1,463	1,716	0,623	
2,247	3,214	1,45	1,523			2,042	1,934	1,326	1,77	0,655	
2,004	2,186	1,316	1,689			1,754	2,509	1,269	1,763	0,922	
2,075	1,914	1,704	1,635			1,43	2,292	1,293	1,739	0,942	
2,145	2,304	1,384	1,632			2,176	2,289	1,535	1,793	0,938	
2,363	2,708	1,349	1,432			2,162	2,117	1,439	1,915	0,888	

2,438	2,991	1,307	1,273			2,025	2,476	1,289	1,875	0,815
1,981	2,542	1,413	1,41			2,256	2,599	1,176	1,823	0,914
2,255	2,676	1,531	1,339			2,23	2,184	1,399	1,865	0,62
2,128	2,735	1,375	1,302			2,579	1,418	1,291	1,267	0,823
2,349	2,689	1,73	1,222			2,516	1,809	1,544	1,221	0,817
2,429	2,329	1,822	1,356			2,757	1,309	1,077	1,668	0,688
2,072	1,971	2,071	1,378			3,324	1,188	1,561	1,989	0,904
2,088	1,919	1,861	1,451			3,443	1,587	1,568	1,306	0,642
2,264	1,802	1,571	1,478			1,736	1,794	1,256	1,47	0,71
1,563	2,29	1,753	0,965			2,624	1,738	0,931	1,598	0,647
1,881	2,235	1,864	1,413			2,34	1,485	1,391	1,698	0,808
1,973	1,921	1,983	1,656			2,626	2,881	1,376	1,823	0,774
2,042	2,395	1,678	1,373			2,375	2,18	1,349	1,582	0,791
1,167	2,877	1,494	2,019			2,427	1,054	0,674	1,412	0,705
1,674	2,602	1,982	1,944			2,207	1,821	1,254	1,276	0,793
1,974	2,18	1,373	1,581			2,237	1,979	1,105	1,086	0,808
1,598	2,417	1,463	1,501			2,288	2,577	1,191	1,435	0,913
1,751	3,171	1,478	1,547			2,346	1,635	1,33	1,73	0,794
1,378	2,494	2,027	1,531			2,83	1,126	1,204	1,555	0,808
1,613	2,708	1,979	1,785			2,649	2,923	1,216	1,362	0,881
2,334	2,431	2,124	1,82			2,415	2,083	1,327	1,176	0,946
2,365	2,855	1,519	1,974			1,957	2,452	1,252	1,262	0,828
2,379	3	1,528	2,263			2,765	2,835	1,245	1,168	0,935
2,485	2,593	1,72	2,631			3,34	2,89	0,928	1,316	0,883
3,665	2,609	1,562	2,461			2,002	3,295	1,325	1,145	0,877
2,664	2,327	1,672	1,96			1,609	1,96	1,393	1,192	0,987
2,452	2,057	2,624	1,942			1,977	1,977	1,376	1,466	0,843
2,244	3,487	2,41	1,962			1,423	2,318	0,873	1,095	0,718
2,147	3,743	2,836	1,118			2,099	1,88	1,386	1,464	0,955
2,119	1,761	2,23	1,514			2,209	1,85	1,335	2,032	0,86
2,312	1,373	2,189	1,703			3,22	1,665	1,409	1,977	0,934
2,707	1,687	1,541	1,651			2,365	2,217	1,419	2,076	0,913
2,569	1,253	1,38	1,508			2,713	1,968	1,559	1,412	0,998
1,903	1,794	1,678	1,425			2,015	1,107	1,63	1,399	1,169
2,513	1,322	1,564	1,742			1,571	1,173	1,422	1,695	0,908
2,865	1,336	1,481	1,789			1,915	1,309	1,873	1,641	1,053
2,759	1,577	3,258	1,708			1,789	1,179	1,796	1,569	cfu: 95
2,837	1,937	3,205	1,768			1,917	1,526	1,218	1,668	0,84845161
1,391	1,859	2,713	1,33			2,189	1,63	1,598	1,971	
1,36	2,057	3,118	1,362			1,644	1,552	2,118	1,842	
1,348	2,267	3,154	1,523			1,853	1,522	1,611	1,486	
1,915	1,747	Cfu: 86	1,575			1,858	1,362	1,413	Cfu: 94	
1,464	2,14	1,81167164	1,569			1,545	1,283	1,617	1,56720896	
2,112	1,672		Cfu: 87			1,678	1,185	1,378		
2,126	1,77		1,68371014			2,72	1,376	0,977		
1,142	2,17					Cfu: 84	Cfu: 92	1,56		
1,815	2,006					2,18530986	2,03049296	Cfu: 106		
1,862	1,448							1,40179167		
1,235	1,602									
1,52	1,623									
1,179	2,166									
1,745	2,657									
Cfu: 115	Cfu: 99									

Tabell A6: Isolat 9389, grovdata tabell 3.1.7. Kolonnene er merket med saliniteten tilsatt BA som mediene er dyrket på. OD for suspensjon: 0,9% NaCl: 3,440 OD for suspensjon 2% NaCl: 3,285

Luft:				CO2:			
0,9% NaCl	0,9% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	0,9% NaCl	0,9% NaCl	2% NaCl	2% NaCl
1,461	1,3	2,722	2,254	0 cfu	0 cfu	2,047	2,442
1,261	1,297	2,314	1,784			1,961	2,703
1,461	1,247	1,962	1,708			2,606	2,717
1,478	1,459	2,056	1,755			2,511	2,502
1,393	1,424	2,656	1,561			1,439	2,211
1,415	1,416	2,114	2,186			1,662	2,62
1,43	1,384	2,817	2,651			1,655	2,41
1,311	1,498	1,716	2,266			1,812	2,548
1,212	1,475	1,758	2,254			2,04	2,846
1,401	1,423	1,969	2,013			1,801	2,732
1,338	1,339	1,974	2,067			1,648	2,633
1,379	1,361	2,25	2,214			2,035	2,899
1,326	1,5525	2,677	1,862			1,787	2,596
1,331	1,435	2,216	1,702			2,202	1,934
1,411	1,167	2,017	1,662			2,372	1,932
1,419	1,367	2,401	1,403			2,634	1,79
1,306	1,376	2,09	2,854			1,702	1,715
1,435	1,221	2,377	2,222			2,274	1,099
1,585	1,407	2,817	1,85			1,654	2,01
1,552	1,393	3,08	1,874			1,661	1,96
1,529	1,323	2,228	2,841			1,551	2,003
1,164	1,433	1,809	3,033			1,738	1,715
1,184	1,362	1,575	3,562			1,648	1,621
1,097	1,257	1,81	3,486			1,785	2,564
1,299	1,464	1,819	2,429			1,804	2,37
1,165	1,432	2,398	2,395			2,669	2,454
1,318	1,578	2,259	3,222			1,878	2,445
1,34	1,542	3,145	1,558			1,836	1,729
1,186	1,192	3,077	1,499			1,999	1,272
1,319	1,25	3,398	1,574			1,57	2,036
0,951	1,374	1,702	1,576			2,071	1,76
1,365	1,107	1,617	1,71			2,042	1,876
1,283	1,254	1,969	1,65			1,393	2,093
1,221	1,461	1,672	1,608			2,066	2,193
1,303	1,264	1,678	1,234			1,978	1,225
1,339	1,294	1,472	1,837			1,952	1,626
1,315	1,194	1,853	2,318			2,389	1,637
1,292	1,154	1,365	2,033			2,43	1,884
1,489	1,216	1,326	1,502			2,846	1,25
1,437	1,132	1,925	1,372			1,833	1,638
1,399	1,161	2,293	1,535			1,63	2,08
1,565	1,151	2,218	1,123			1,626	2,51
Cfu: 49	1,217	2,19	1,34			1,758	2,309
1,34440476	1,277	2,587	1,361			1,795	1,754
	1,208	2,658	1,36			1,322	1,893
	1,245	1,925	1,393			1,717	1,583
	1,392	2,244	1,517			1,717	1,891
	1,256	2,915	1,702			1,908	1,795
	1,298	3,09	1,301			1,881	1,763

	1,298	3,09	1,301			1,881	1,763
	1,419	2,365	1,454			1,848	1,204
	1,409	2,775	1,544			2,169	2,174
	1,592	2,859	2,225			2,388	2,735
	1,461	2,836	2,277			2,426	1,808
	Cfu: 61	3,379	2,907			2,683	2,17
		3,553	1,622			2,721	1,852
		2,734	1,784			Cfu: 65	2,216
		2,57	2,699				Cfu: 66
	Cfu: 69		2,439				
			1,938				
			2,156				
			2,654				
			2,213				
			2,336				
			2,805				
			2,034				
			1,975				
			1,628				
			1,64				
			1,821				
			2,268				
			2,017				
			2,107				
			2,213				
			2,631				
			2,971				
			Cfu: 85				

Tabell A7: Resultat fra kolonidiametermålinger av isolat 9523 fra 24.11.15. Kolonidiameteren vises i mm. OD: 1,5% NaCl: 3,008, OD: 2% NaCl: 2,930

Luft:						CO2:					
2% NaCl	2% NaCl	Plasma	Plasma	RBC	RBC	2% NaCl	2% NaCl	Plasma	Plasma	RBC	RBC
1,772	1,992	1,472	1,043	1,05	1,088	2,539	1,596	1,036	1,194	2,173	1,631
1,509	1,679	1,233	0,833	0,932	0,99	1,621	1,665	1,038	1,349	1,895	1,424
1,668	1,733	1,044	0,886	0,975	1,01	2,218	1,405	1,404	1,147	1,422	1,552
1,953	1,457	1,024	0,878	0,875	0,923	1,803	1,491	1,696	1,246	1,782	1,052
1,656	1,694	0,987	0,94	0,833	0,946	1,675	1,388	1,425	0,979	1,529	0,946
1,564	1,691	1,089	0,853	0,86	0,93	1,408	1,185	1,236	1,255	1,17	1,376
1,185	1,665	1,216	1,082	0,852	0,915	1,497	0,93	0,952	1,306	1,628	1,212
1,79	1,344	1,352	0,727	0,852	0,947	1,144	1,492	1,015	1,782	1,179	1,394
1,259	1,347	1,111	0,869	0,936	0,946	1,166	1,631	1,262	1,297	1,61	1,592
1,639	1,438	1,086	0,764	0,863	0,962	1,596	1,724	0,933	1,558	1,36	1,333
2,275	1,573	1,007	0,983	0,872	1,107	1,657	1,367	1,001	1,491	1,091	1,286
1,836	1,521	1,138	0,781	0,904	1,055	1,284	1,54	1,281	1,384	1,295	1,15
1,696	1,881	0,706	0,658	0,93	0,917	1,713	1,057	1,214	1,591	1,315	1,063
1,794	1,499	0,921	0,803	0,904	1,032	1,812	1,36	1,042	1,831	1,339	1,308
1,662	1,206	1,092	0,888	0,81	1,086	1,912	1,671	1,119	1,877	1,683	0,94
1,609	1,072	1,308	0,656	0,793	1,103	1,42	1,241	1,434	1,497	1,649	1,165
1,349	1,315	1,059	0,727	0,921	1,067	1,34	1,615	1,28	1,551	1,975	1,132
1,149	1,251	0,918	0,692	0,963	1,051	1,678	1,749	1,116	1,445	1,795	1,282
1,225	1,438	0,818	0,781	0,906	1,078	1,425	1,587	0,979	1,781	1,67	1,164
1,404	1,556	0,948	0,834	0,922	1,081	1,221	1,635	1,186	1,975	0,94	1,487
2,868	1,584	0,927	0,817	0,693	1,098	1,371	1,555	1,493	1,701	1,341	1,6
2,611	1,68	0,97	0,94	0,869	1,005	1,617	1,124	0,902	1,889	0,808	1,373
1,965	1,765	0,88	0,763	0,8	1,057	1,834	1,583	1,182	1,371	1,352	1,468
2,058	1,79	0,87	0,819	0,781	1,119	1,876	0,0947	0,835	1,592	1,322	0,921
1,664	1,426	0,635	0,822	0,887	1,054	1,314	1,635	1,121	1,532	0,825	1,308
1,688	1,558	1,059	0,697	0,923	1,255	0,968	1,284	0,835	1,941	1,219	0,966
1,838	1,326	0,925	0,923	0,869	1,046	1,427	1,744	1,135	2,26	1,374	0,981
1,558	1,404	1,126	0,64	0,882	1,072	1,372	1,417	0,961	1,545	1,475	1,114
1,331	1,343	1,163	0,886	0,848	0,948	0,878	1,829	1,171	1,702	1,194	1,438
1,256	1,253	1,076	0,71	0,856	1,021	1,282	1,654	1,36	1,641	1,491	1,425
1,249	1,137	1,275	0,727	0,822	0,952	1,396	1,14	1,106	1,422	1,371	1,037
1,295	1,308	1,115	0,817	0,941	0,956	1,167	1,407	0,851	1,525	1,161	1,05
0,963	1,028	1,094	0,979	0,75	0,959	1,827	1,453	1,05	1,167	1,115	1,081
1,222	1,465	0,981	0,82	0,835	0,791	1,648	1,645	0,585	1,456	1,317	1,322
1,291	1,229	1,034	0,787	0,842	0,952	1,468	1,567	1,072	1,885	1,161	1,086
1,228	1,209	1,067	0,698	0,838	0,99	1,574	1,813	1,025	1,888	0,86	0,874
1,478	1,352	1,183	0,639	0,93	0,971	1,561	1,111	1,183	1,789	1,327	0,949
1,183	1,393	1,241	0,745	0,835	0,98	2,227	1,152	1,198	1,484	1,923	1,082
1,215	1,191	0,938	0,803	0,869	0,947	1,885	1,605	1,325	1,453	1,783	0,957
0,92	1,283	0,817	0,656	0,766	0,934	1,938	0,739	1,2	1,261	1,422	0,804
1,274	1,22	0,889	0,781	0,77	1,046	1,247	1,415	1,169	1,672	1,317	0,926
1,313	1,312	0,761	1,028	0,851	0,925	1,25	0,98	1,005	1,682	0,701	1,304
1,543	1,403	0,945	0,94	0,856	0,643	1,984	1,433	1,251	1,545	1,047	0,981
1,28	1,302	0,735	0,833	0,8	0,87	1,844	0,978	1,222	1,74	1,14	0,88
1,225	1,062	0,832	0,798	0,841	0,757	1,699	1,641	1,186	1,854	1,49	0,761
1,23	1,295	1,059	0,695	0,785	1,016	1,458	1,345	1,033	1,685	0,701	1,34
1,502	1,337	0,554	0,923	0,813	0,932	0,969	1,67	1,283	1,33	1,206	1,425
1,561	1,485	0,709	0,922	0,797	0,758	0,828	1,446	0,993	1,277	0,846	1,568
1,583	1,371	0,867	1,011	0,798	0,801	0,817	1,518	0,999	1,497	1,103	0,903
1,543	0,938	0,883	0,766	0,882	0,909	0,971	1,721	0,796	1,404	1,285	1,12
1,619	1,215	0,772	0,819	0,912	0,987	1,052	1,435	1,261	1,45	0,539	1,132
1,589	1,477	0,915	0,747	0,89	0,936	1,068	1,391	0,965	1,531	0,874	0,903
2,63	1,349	0,804	1,011	0,762	0,992	0,669	0,936	1,277	1,721	1,148	1,308
2,453	1,558	0,696	0,887	0,885	1,009	0,977	1,691	1,484	1,415	1,287	0,937
2,428	1,539	0,649	0,906	0,96	0,86	0,725	1,521	1,59	1,552	1,115	0,882
2,222	1,677	0,82	0,886	0,827	0,889	0,678	1,204	1,162	1,318	0,739	0,955
1,903	1,449	0,885	0,869	0,922	0,907	0,81	1,435	1,498	1,063	1,272	1,022
1,628	1,586	0,709	0,888	0,942	0,838	1,081	1,542	1,4	1,059	0,994	1,195
1,975	1,571	0,724	0,782	1,14	0,898	1,135	1,262	1,324	1,088	0,876	1,589
1,201	1,6	0,716	0,763	0,92	0,93	0,726	1,576	1,374	1,024	1,332	1,355
1,235	1,478	0,801	0,732	0,848	0,914	1,261	1,576	1,135	1,249	1,071	1,406

0,956	1,754	0,801	1,176	0,975	0,903	0,979	1,665	1,41	1,406	1,296	1,477
1,185	1,62	1,078	1,39	0,959	0,933	1,39	1,821	1,349	1,011	1,221	1,012
1,107	1,027	0,817	1,225	1,051	0,872	1,912	1,793	0,9	1,454	1,226	1,212
1,128	1,325	0,892	1,356	0,94	0,929	1,42	1,529	1,583	0,962	1,204	1,237
1,162	1,663	0,829	1,281	0,942	0,87	1,639	1,378	1,62	1,058	1,496	1,371
1,343	1,507	0,841	1,269	0,921	1,057	1,513	1,273	1,263	1,166	0,924	1,305
1,322	1,207	0,866	1,368	1,003	0,937	1,799	1,665	1,244	1,609	1,185	1,368
1,33	1,511	0,954	1,344	1,023	0,898	1,496	1,463	0,995	0,978	1,152	1,438
1,013	1,191	1,004	1,35	0,985	0,93	1,653	1,391	1,631	1,246	0,983	1,504
1,064	1,154	0,757	1,092	1,021	0,946	0,839	1,349	1,348	0,978	1,239	1,242
1,224	1,176	0,682	1,163	0,82	0,883	0,952	1,393	1,36	1,135	1,192	1,015
1,637	1,204	0,767	1,214	0,858	0,891	1,529	1,545	1,362	0,885	0,992	1,381
1,408	1,183	0,821	1,312	0,948	0,843	0,987	1,472	1,35	1,182	1,721	1,226
1,47	1,118	0,816	1,521	0,909	0,87	0,899	1,648	1,359	0,804	1,128	0,914
1,237	1,501	0,887	1,07	1,082	0,953	1,531	1,756	1,304	0,868	1,211	1,027
1,39	1,329	0,834	1,685	0,907	0,797	1,372	1,548	1,261	0,634	1,4	1,144
1,48	1,831	0,691	1,248	0,993	0,868	1,783	1,841	1,142	1,214	1,319	0,879
1,662	1,79	0,709	1,38	0,834	0,788	0,952	1,56	1,467	1,139	1,375	0,849
1,521	1,296	0,677	1,342	0,965	0,821	1,303	1,18	1,05	1,645	0,673	1,487
1,752	1,36	0,639	1,325	0,887	0,892	1,248	1,269	1,052	1,189	1,339	1,051
1,468	0,903	0,692	1,363	0,941	0,807	1,457	1,253	1,302	1,39	1,198	1,444
1,232	1,398	0,763	1,359	0,963	0,867	1,229	1,226	1,152	1,565	0,876	1,199
1,348	1,288	0,887	1,274	0,805	0,796	1,34	1,18	1,37	1,292	1,229	1,226
1,517	1,713	0,816	0,816	0,926	0,789	1,119	1,56	1,351	1,422	1,266	1,28
1,313	1,655	0,745	1,454	0,958	0,82	0,839	1,841	1,139	0,97	1,347	1,539
1,065	1,681	0,887	1,278	1,034	0,825	1,182	1,548	1,095	1,232	1,211	0,928
1,335	1,334	0,798	0,709	0,834	0,876	1,436	1,756	1,177	1,218	1,317	1,044
1,356	1,094	0,709	1,136	0,79	0,839	1,44	1,648	0,977	1,088	1,145	1,024
1,262	1,173	0,904	1,33	0,809	0,947	1,632	2,405	1,306	1,198	1,378	1,056
1,272	1,3	1,117	1,123	0,888	1,009	1,898	1,462	1,473	1,434	0,911	0,87
1,191	1,248	0,656	0,744	0,74	0,918	1,077	1,598	1,671	1,072	1,501	1,126
1,232	1,023	0,981	1,144	0,94	0,73	1,29	1,791	1,276	1,297	1,251	1,162
1,534	1,229	0,816	1,259	0,73	0,77	1,208	1,911	1,211	1,226	0,968	1,026
1,437	1,386	1,259	1,36	0,79	0,635	0,912	1,961	1,361	1,174	1,342	1,204
1,162	1,176	0,904	1,278	0,968	0,788	1,22	2,112	1,346	1,236	1,243	1,325
1,452	1,179	0,745	1,322	0,856	0,808	1,277	1,884	1,45	1,388	0,949	1,05
1,467	1,228	0,747	1,385	0,809	0,729	1,104	2,054	0,86	1,435	1,085	1,273
1,554	1,285	0,713	1,379	0,895	0,952	1,136	1,387	1,32	0,98	0,971	1,431
1,136	1,462	0,691	1,418	0,858	0,86	0,946	1,327	1,356	1,232	1,092	1,497
1,39	1,343	0,817	1,33	0,967	0,811	0,769	1,396	1,106	1,062	1,114	1,237
1,35	0,804	0,708	1,295	0,922	0,835	1,197	1,555	1,462	0,851	1,093	1,093
1,263	1,133	0,692	1,295	0,83	0,835	1,01	1,585	1,301	0,977	0,97	0,845
1,395	1,122	0,551	1,247	0,782	0,85	1,191	1,548	2,022	1,112	0,975	1,282
1,195	1,204	0,727	1,184	0,764	0,898	0,723	1,768	1,654	1,388	1,081	1,586
1,027	0,927	0,568	1,254	0,763	0,867	0,714	1,733	1,713	1,187	0,903	1,243
1,205	1,296	0,727	0,977	0,816	0,894	0,952	1,889	1,707	0,774	1,294	1,199
1,161	1,119	1,05	1,437	0,801	0,49	1,026	1,528	2,005	1,261	1,357	1,6
1,465	1,198	0,94	1,098	0,828	0,978	1,576	1,889	1,844	0,757	1,093	1,217
1,514	1,35	0,922	1,224	0,72	0,838	1,366	1,733	1,735	1,188	1,346	0,976
1,472	1,211	0,822	1,437	0,783	0,759	1,645	1,768	1,277	1,284	1,197	1,324
1,332	1,206	1,17	1,204	0,779	0,97	1,246	1,671	1,656	1,076	1,376	1,527
1,293	1,127	0,836	1,158	0,813	0,936	2,031	1,661	Cfu: 130	1,119	0,845	1,123
1,36	1,213	1,099	1,268	0,806	0,782	1,447	1,403	1,2533125	1,171	1,03	1,123
1,254	1,241	0,833	1,247	0,792	1,015	1,368	2,069		0,852	1,301	0,966
1,242	1,198	0,922	1,383	0,72	0,962	1,013	1,835		1,088	1,282	1,041
1,839	1,29	0,621	1,484	0,926	0,832	0,949	1,525		1,132	1,207	0,827
1,451	1,024	Cfu: 138	1,429	0,7	0,917	1,416	1,725		0,995	1,044	1,019
1,108	1,371	1,13081624	1,489	0,787	0,833	1,159	1,205		0,811	1,036	0,971
1,627	1,015		1,507	0,729	0,87	1,277	0,788		0,914	0,947	1,472
1,435	0,892		1,309	0,798	1,056	1,116	1,042		1,056	1,656	1,215
1,35	1,086		1,331	0,78	0,915	1,394	0,691		1,104	1,508	0,852
1,427	1,26		1,36	0,863	0,901	1,362	0,911		0,85	1,435	1,246
1,338	1,154		1,157	0,842	1,044	1,862	0,884		0,979	0,775	1,438
1,468	1,072		1,364	0,785	0,954	1,024	0,908		1,308	1,495	1,248
1,631	1,111		1,246	1,064	0,852	1,664	1,082		1,396	1,238	1,527
1,474	1,248		1,206	0,676	0,917	0,891	0,864		1,185	1,399	1,685

1,138	1,465		1,383	0,775	1,095	1,487	1,107		1,083	1,46	1,61
1,197	1,685		1,454	0,662	1,104	1,327	1,001		1,048	1,406	1,527
0,901	1,162		1,437	0,732	1,065	1,902	1,144		1,259	1,552	1,152
1,419	1,131		1,418	0,715	1,099	1,989	1,282		1,191	1,469	1,133
1,007	1,151		1,457	0,904	1,074	1,99	1,097		1,054	0,943	1,552
0,992	1,122		1,263	0,887	0,897	1,871	1,215		1,286	0,846	1,241
1,282	1,189		1,241	0,838	0,971	1,404	1,086		1,193	1,095	1,015
1,194	1,246		1,669	0,893	0,912	1,587	1,006		1,284	1,353	1,261
1,161	1,522		1,269	0,845	0,98	2,385	0,951		1,06	0,87	1,635
1,27	1,371		1,773	0,929	0,916	1,738	0,936		1,391	1,215	1,407
2,339	1,474		1,582	0,926	0,948	1,917	0,867		1,036	1,171	1,136
2,296	1,324		1,511	0,953	1,024	1,642	0,914		Cfu: 150	0,892	1,212
1,883	Cfu: 230		1,011	1,047	1,04	2,315	1,063		1,29098621	1,067	1,378
1,671	1,33624658		1,158	0,85	1,059	2,405	1,207			1,153	1,494
1,871			1,867	0,982	0,979	1,638	1,571			1,204	1,359
1,953			1,824	0,898	1,208	1,728	1,284		Cfu: 185		1,25
1,472			2,244	0,904	1,143	1,981	1,662		1,22407383		1,149
1,308			1,277	0,96	1,186	2,014	1,48				1,396
1,439			1,259	0,89	1,159	1,814	1,516				1,636
1,366			1,445	1,162	0,925	1,864	1,549				1,66
2,626			1,318	1,059	0,902	1,389	1,741				1,093
2,602			1,572	0,943	1,054	2,091	1,841				1,793
1,466			1,649	0,946	1,14	1,298	1,575				1,33
1,467			0,785	0,878	0,982	1,817	1,371				1,454
1,606			1,507	0,835	1,132	1,549	0,995				1,734
1,756			1,548	1,068	0,972	1,107	1,31				1,619
2,026			1,37	1,019	1,059	1,677	0,82				1,657
2,352			1,134	0,994	1,001	1,244	0,77				1,744
1,644			1,084	1,007	0,919	1,601	0,997				1,376
1,926			1,126	0,948	1,001	1,498	0,609				1,571
1,661			1,154	1,017	0,981	1,161	1,06				1,178
1,809			1,047	0,889	0,963	1,347	1,491				1,356
1,276			1,209	0,909	0,963	0,792	1,511				1,245
1,371			1,355	0,808	1,001	1,266	1,124				1,876
1,482			1,617	0,764	0,85	1,549	1,347				1,191
1,186			1,765	0,804	1,008	1,109	1,29				1,405
1,365			1,458	0,985	0,915	1,249	1,22				1,428
1,32			1,626	0,889	0,932	1,052	1,223				1,565
1,245			1,35	0,928	0,796	0,821	1,286			Cfu: 281	
1,12		Cfu: 141		0,855	0,987	0,891	1,518				
1,425				0,837	0,935	1,232	1,473				
1,204				0,749	0,977	1,18	1,298				
Cfu: 220				0,805	0,816	1,262	1,66				
				0,899	0,907	0,986	1,2				
				0,954	0,898	1,25	0,952				
				0,914	0,925	0,898	0,733				
				1,468	0,901	1,052	0,957				
				0,928	0,86	1,258	0,992				
				0,903	0,82	1,241	1,101				
				0,86	0,807	0,851	1,11				
				0,915	0,817	0,952	1,087				
				0,832	0,93	1,217	0,773				
				0,826	1,167	0,987	0,81				
				0,86	1,027	1,144	0,876				
				0,993	0,972	1,016	0,677				
				0,858	0,987	1,25	0,895				
				0,963	1,065	1,182	0,942				
				1,033	1,001	0,692	1,058				
				0,91	0,98	1,385	0,862				
				0,977	1,042	1,314	1,263				
				1,014	Cfu: 316	1,027	1,014				
				1,012		1,171	1,397				
				0,99		1,233	0,988				
				0,956		1,466	1,204				
				0,858		1,099	1,097				
				1,005		1,461	1,37				
				1,009		1,271	1,057				
				0,925		1,208	1,655				
				1,044		1,396	1,124				
				0,946		1,581	1,592				
				0,93		1,648	1,092				
				0,833		1,741	0,86				
				0,792		1,752	1,43				
				0,883		1,316	1,389				
				0,932		1,539	1,03				
				0,888	95	1,309	0,79				
				1,016		1,251	Cfu: 281				
			Cfu: 240			1,003					
					Cfu: 269						

Tabell A8: Isolat 9523, grovdata for tabell 3.1.9; kolonnene er merket med saliniteten tilsatt BA som mediene er dyrket på. OD for suspensjon: 0,9% NaCl: 3,154, OD for suspensjon 1,5% NaCl: 2,929

Luft:				CO2:			
0,9% NaCl	0,9% NaCl:	1,5 % NaCl:	1,5 % NaCl:	0,9% NaCl:	0,9% NaCl:	1,5% NaCl:	1,5% NaCl:
0 cfu	0 cfu	1,246	1,55	0 cfu	0 cfu	1,205	1,707
		1,235	1,077			1,959	0,874
		1,487	1,488			1,865	1,252
		1,378	1,442			2,09	1,877
		1,668	1,472			2,222	1,819
		1,522	1,567			1,993	2,172
		1,361	1,433			1,434	2,251
		1,363	1,694			2,27	1,785
		1,445	1,335			2,299	1,689
		1,51	1,648			2,325	1,743
		1,228	1,464			1,955	1,819
		1,52	1,49			1,371	1,434
		1,303	1,703			2,059	1,28
		1,182	1,597			1,95	1,442
		0,967	1,408			1,736	1,348
		1,406	1,617			1,884	1,337
		1,346	1,486			1,401	1,635
		1,723	1,668			1,568	1,487
		1,21	1,656			2,067	2,094
		1,215	1,758			1,474	2,354
		1,294	1,578			1,123	2,061
		0,73	1,853			1,943	2,18
		0,837	1,256			1,929	1,869
		0,908	1,42			2,192	1,565
		1,115	1,713			2,357	1,788
		1,321	1,369			2,015	1,666
		0,992	1,052			1,495	2,131
		1,272	1,494			1,485	2,8
		1,256	1,649			1,855	2,1104
		1,028	1,197			2,444	1,787
		0,882	1,329			2,383	2,4003
		1,158	1,575			2,491	1,616
		0,822	1,522			1,908	2,487
		1,059	1,313			1,857	1,68
		1,17	0,949			2,191	2,09
		1,55	0,889			1,296	2,104
		1,545	0,964			1,234	1,858
		1,389	1,383			1,798	1,764
		1,207	1,17			1,372	2,526
		1,094	0,953			1,765	2,02
		1,343	0,901			1,64	1,696

0,94	1,528			1,55	1,887
1,07	1,826			1,334	2,086
1,195	1,615			1,654	2,012
1,184	0,862			1,742	2,277
1,226	1,186			1,872	2,452
1,357	1,163			1,462	2,067
1,272	1,439			1,49	1,747
1,399	1,418			1,647	2,112
1,252	1,028			0,98	1,791
1,272	1,343			1,205	1,276
1,357	1,056			1,543	1,803
1,339	1,507			1,276	1,42
1,327	1,543			1,758	1,937
1,287	1,096			1,487	1,727
1,497	0,971			1,363	1,802
1,302	1,149			1,596	1,971
1,381	1,422			Cfu: 210	1,47
1,287	0,897				1,501
1,39	1,046				1,213
1,697	0,842				1,566
0,919	1,497				0,894
1,287	1,523				1,495
1,297	1,247				0,973
0,958	1,564				1,642
1,414	1,428				0,642
0,756	1,068				1,284
1,841	1,499				1,79
1,6	1,037				1,094
1,339	1,723				1,713
1,238	1,825				1,399
1,024	1,666				1,418
0,671	1,799				1,953
1,258	1,684				1,46
1,207	1,433				1,362
0,964	1,17				2,053
1,378	1,225				1,448
1,358	1,204				1,047
1,318	0,964				1,15
1,259	1,03				1,054
1,629	0,901				1,044
1,538	0,873				1,416
1,555	1,319				1,197
1,547	1,108				0,863
1,741	1,311				1,068
1,554	1,077				1,085
1,163	1,015				0,769
0,974	1,09				1,131
1,095	0,782				0,892
0,899	0,725				1,108
0,616	1,03				0,914
0,974	1,013				1,179
0,937	1,199				1,061
0,856	1,196				1,246
0,963	1,107				1,27
0,916	1,067				1,345
0,858	1,03				1,163
0,963	Cfu: 232				1,297
0,938	1,30704972				1,336
1,117					1,204
1,086				Cfu: 235	
1,141					
1,16					
1,315			97		
Cfu: 277					

Tabell A9: Isolat 4081, grovdata for tabell 3.1.10. Kolonnene er merket med saliniteten tilsatt BA som mediene er dyrket på. OD for suspensjon: OD for suspensjon 1,5% NaCl: 3,021, OD for suspensjon 2% NaCl: 3,168

Luft:				CO2:			
1,5% NaCl:	1,5% NaCl:	2% NaCl:	2% NaCl:	1,5% NaCl:	1,5% NaCl:	2% NaCl:	2% NaCl:
2,004	2,075	2,398	1,661	3,587	3,851	2,886	3,142
2,138	1,481	2,108	1,692	2,737	4,572	2,916	3,327
2,138	1,604	1,851	1,361	2,847	3,239	3,117	2,745
1,889	2,329	1,968	1,495	2,791	3,336	2,868	3,721
2,027	1,978	2,142	1,995	1,792	2,952	2,905	3,189
1,835	2,286	2,142	2,721	3,173	4,723	3,266	2,342
1,812	2,172	2,418	1,995	2,561	3,378	2,904	2,72
2,111	2,146	1,678	2,083	3,076	4,412	2,823	3,233
2,138	2,408	1,828	2,269	3,248	3,159	3,172	2,929
2,177	2,229	1,918	2,713	3,641	3,774	4,013	3,183
1,888	2,381	1,907	2,1	3,814	2,843	3,022	2,479
1,928	2,086	2,265	2,396	3,222	3,248	3,064	2,39
1,595	1,78	1,949	2,624	3,893	3,289	3,126	3,576
1,441	1,979	2,483	2,731	2,332	4,712	3,241	2,973
1,6	2,778	1,75	2,545	2,705	2,77	3,877	Cfu: 14
1,838	2,681	1,977	1,889	2,396	3,344	3,78	
2,221	2,316	1,953	2,729	3,165	Cfu: 17	3,068	
2,064	2,296	1,938	2,381	3,172		4,257	
2,085	2,742	2,353	2,196	3,072		3,323	
2,112	1,997	2,073	2,794	3,32		4,126	
2,21	2,864	2,089	2,37	3,623		3,069	
1,25	2,418	2,158	2,433	3,399		Cfu: 21	
2,152	1,931	1,784	2,04	3,572			
2,147	2,282	2,271	2,08	3,538			
2,312	1,847	1,904	2,5	2,356			
1,806	2	2,303	Cfu: 26	3,118			
2,361	2,136	2,199		3,172			
2,124	2,059	2,234		2,882			
2,221	2,657	Cfu: 29		3,911			
2,106	2,112			3,536			
1,923	2,756			2,588			
1,548	2,181			2,356			
1,721	2,63			3,678			
2,061	2,311			2,766			
2,163	2,284			3,217			
1,934	1,87			3,289			
2,193	2,09			3,054			
2,307	2,253			2,831			
Cfu: 42	1,985			cfu: 39			
	2,173						
	2,754						
	Cfu: 44						

Tabell A10: Resultat fra kolonidiametermålinger av isolat 9758, grovdata for tabell 3.1.12.. Kolonidiameteren vises i mm.
 OD: 1,5% NaCl: 2,845

Luft:					CO2:						
1,5% NaCl:	1,5% NaCl:	RBC:	RBC:	Plasma:	1,5% NaCl	1,5% NaCl	RBC:	RBC:	Plasma:	Plasma:	
0,804	0,985	0,804	0,991	0,892	0,73	0,942	0,667	1,12	1,098	1,084	
0,861	0,96	1,011	1,036	0,953	0,8	0,902	0,775	0,937	1,046	0,962	
0,778	0,77	0,859	1,152	1,157	0,838	0,872	0,863	0,818	0,984	1,113	
0,702	0,823	0,975	0,992	0,933	0,762	0,833	0,966	0,955	0,769	0,992	
0,803	0,738	0,903	1,066	1,056	0,846	0,886	0,737	0,903	1,08	0,944	
0,769	0,77	0,882	1,217	1,174	0,85	0,953	0,451	0,865	1,095	0,839	
0,785	0,821	0,813	1,107	1,047	0,721	0,798	0,959	0,985	1,191	0,798	
0,776	0,757	0,89	1,028	1,032	0,748	0,825	0,815	0,916	0,959	0,692	
0,868	0,72	0,857	1,092	1,047	0,823	0,771	0,958	0,868	0,882	0,815	
0,846	0,872	0,849	1,028	1,137	0,671	0,734	0,844	0,783	1,081	0,743	
0,59	0,447	0,899	1,106	0,983	0,737	0,86	0,92	1,096	0,86	0,86	
0,781	0,986	1,038	1,206	0,816	0,788	0,545	0,747	1,058	1,203	0,791	
0,569	0,654	1,278	0,967	0,905	0,795	0,83	1,136	0,985	0,888	0,976	
0,857	0,737	1,092	1,063	0,889	0,628	0,748	0,656	0,949	1,063	0,947	
0,652	0,777	0,933	0,979	0,817	0,781	0,722	0,775	1,248	1,019	0,691	
0,768	0,817	0,929	0,872	0,976	0,751	0,73	0,734	0,971	1,048	0,581	
0,804	0,691	1,085	1,218	0,905	0,511	0,699	0,821	1,081	0,902	0,814	
0,719	0,429	1,017	1,033	0,942	0,693	0,779	0,788	1,092	0,894	0,762	
0,704	0,845	0,976	1,333	0,892	0,814	0,778	0,913	1,044	0,904	0,691	
0,814	0,851	1,126	1,049	1,087	0,837	0,714	0,953	1,021	0,78	0,78	
0,96	0,785	0,928	1,174	1,048	0,63	0,782	0,997	1,103	1,004	0,624	
0,872	0,976	1,171	1,038	1,024	0,721	0,755	0,651	1,138	1,044	0,867	
0,662	0,83	0,953	0,928	1,088	0,666	0,803	1,09	1,104	0,938	1,107	
0,862	0,798	0,94	0,787	0,835	0,751	0,699	0,984	0,927	0,86	0,966	
0,847	0,753	0,715	1,028	1,012	0,66	0,643	1,007	1,404	0,846	0,766	
0,955	0,741	1,116	0,982	0,782	0,672	0,833	0,957	1,094	0,719	0,849	
0,814	0,889	1,028	0,961	1,118	0,533	0,768	1,072	1,028	1,107	0,86	
0,953	0,722	1,351	0,704	0,706	0,699	0,657	1,028	1,082	0,994	1,054	
0,904	0,722	1,22	0,681	0,554	0,674	0,712	0,87	0,953	1,015	0,914	
0,577	0,69	1,231	0,771	0,66	0,73	0,804	0,856	1,04	0,977	0,893	
0,68	0,494	1,043	1,034	0,794	0,747	0,79	0,745	0,999	0,817	1,041	
1,004	0,746	0,936	1,038	0,654	0,722	0,789	0,668	1,227	0,936	0,571	
0,8	0,889	0,863	1,077	0,552	0,708	0,837	0,747	1,206	0,938	0,826	
0,769	0,754	1,412	0,821	0,63	0,616	0,994	0,87	0,927	0,99	1,008	
0,805	0,751	1,142	0,892	0,734	0,637	0,668	0,964	0,997	1,162	0,911	
0,669	0,818	0,842	0,967	0,723	0,637	0,856	1,083	1,449	0,789	0,914	
0,846	0,682	1,077	1,28	0,914	0,648	0,823	0,854	0,994	0,933	0,958	
0,825	0,718	0,681	0,915	0,682	0,735	0,747	1,086	1,04	1,036	0,914	
0,927	0,841	1,126	1,048	0,651	0,618	0,815	0,799	1,227	1,015	0,938	
0,925	0,765	0,967	1,044	0,882	0,512	0,87	1,068	1,206	1,003	1,056	
0,638	0,699	0,978	1,206	0,817	0,865	0,886	0,969	0,953	0,792	0,984	
0,973	0,88	1,131	1,015	0,662	0,766	0,831	1,203	1,082	0,687	0,757	
1,006	0,833	1,071	0,953	0,759	0,734	0,784	0,95	1,16	0,807	0,936	
0,99	0,691	1,103	0,803	0,931	0,812	0,762	1,156	1,344	1,141	0,966	
0,822	0,858	1,107	0,836	0,898	0,722	0,803	0,925	0,977	1,098	0,865	
0,94	0,802	1,185	0,906	0,955	0,699	0,63	1,061	1,223	0,791	0,804	
0,81	0,654	1,189	1,053	0,96	0,759	0,799	0,923	1,135	1,07	1,007	
0,914	0,825	1,011	0,84	0,73	0,786	0,67	0,832	1,016	0,882	0,981	
0,839	0,769	0,886	0,754	0,777	0,764	0,652	0,755	0,698	1,089	1,038	
0,836	0,96	1,124	1,014	0,819	0,741	0,619	0,969	1,097	1,041	1,08	
0,858	0,825	1,016	0,975	0,981	0,798	0,755	0,606	0,951	0,106	1,056	
0,855	0,876	1,023	0,991	0,981	0,639	0,748	0,712	1,019	0,958	0,925	
0,805	0,879	0,958	0,908	0,887	0,764	0,417	0,893	0,921	0,883	0,833	
0,818	1,009	0,969	1,099	1,029	0,764	0,76	0,739	0,905	0,922	0,868	
0,796	0,968	0,773	0,862	0,744	0,695	0,695	0,824	0,915	0,891	0,918	
0,712	1,042	0,829	0,934	0,882	0,846	0,582	0,777	0,879	0,968	0,949	
0,872	0,966	1,205	0,848	0,912	0,737	0,609	0,867	1,016	1,069	1,076	
0,949	0,892	1,171	0,954	0,619	0,751	0,756	0,936	1,164	1,067	0,992	
0,857	0,826	0,992	1,107	0,68	0,741	0,653	0,914	0,862	0,927	0,979	

0,855	0,876	1,023	0,991	0,981	0,639	0,748	0,712	1,019	0,958	0,925
0,805	0,879	0,958	0,908	0,887	0,764	0,417	0,893	0,921	0,883	0,833
0,818	1,009	0,969	1,099	1,029	0,764	0,76	0,739	0,905	0,922	0,868
0,796	0,968	0,773	0,862	0,744	0,695	0,695	0,824	0,915	0,891	0,918
0,712	1,042	0,829	0,934	0,882	0,846	0,582	0,777	0,879	0,968	0,949
0,872	0,966	1,205	0,848	0,912	0,737	0,609	0,867	1,016	1,069	1,076
0,949	0,892	1,171	0,954	0,619	0,751	0,756	0,936	1,164	1,067	0,992
0,857	0,826	0,992	1,107	0,68	0,741	0,653	0,914	0,862	0,927	0,979
0,833	0,802	1,154	0,889	0,704	0,81	0,658	0,92	0,758	1,059	0,96
0,749	0,852	1,091	0,773	0,654	0,735	0,583	1,03	1,148	0,953	0,981
0,785	0,948	1,224	0,93	0,757	0,71	0,626	0,892	1,249	0,947	0,944
0,648	1,032	1,141	0,858	0,82	0,735	0,551	1,018	1,139	0,648	1,067
0,749	0,965	1,082	0,7	0,729	0,782	0,602	1,109	0,916	1,096	1,047
1,064	0,788	1,141	0,643	0,745	0,761	0,716	1,172	0,719	1,228	0,955
0,776	0,842	1,028	0,971	0,778	0,635	0,59	0,979	0,889	0,948	0,906
0,834	0,857	1,087	0,966	0,728	0,672	0,666	1,246	1,088	0,995	0,94
0,833	0,695	1,104	1,171	0,714	0,768	0,744	1,03	0,848	0,994	1,017
0,898	0,913	1,067	1,158	0,841	0,678	0,665	1,087	1,092	0,87	0,82
0,886	0,753	1,091	0,937	0,794	0,761	0,665	1,028	0,959	1,025	0,941
0,94	0,798	0,885	0,855	0,735	0,747	0,681	1,094	1,059	0,852	0,823
0,918	0,83	0,621	0,925	0,774	0,708	0,759	1,077	1,106	0,881	0,73
0,846	0,976	1,218	1,086	0,841	0,373	0,961	1,115	1,183	0,591	0,816
0,936	0,785	0,979	0,97	0,864	0,747	1,013	1,309	0,613	0,703	1,023
0,909	0,851	1,129	0,903	0,913	0,737	0,858	0,905	0,906	0,814	0,889
0,846	0,429	0,742	0,787	0,753	0,493	0,796	1,077	0,992	0,702	0,856
0,925	0,845	1,152	1,063	0,873	0,766	0,886	0,874	1,181	0,63	0,816
0,749	0,691	0,841	1,279	0,852	0,834	0,817	1,072	1,229	0,729	0,853
0,846	0,817	0,955	1,047	0,722	0,838	0,773	0,594	1,003	0,704	0,878
0,887	0,737	0,976	1,137	0,905	0,779	0,842	0,934	1,217	0,702	0,944
0,731	0,777	1,213	1,156	1,166	0,721	0,814	1,117	0,928	0,785	0,968
0,974	0,741	1,166	1,003	0,658	0,739	0,842	1,124	0,892	0,981	0,979
1,036	0,889	1,15	0,968	0,787	0,799	0,778	1,001	1,14	1,016	0,941
0,914	0,722	1,011	0,848	0,68	0,764	0,851	1,083	1,263	0,973	1,006
0,962	0,858	1,044	1,148	0,8	0,706	0,761	0,979	0,968	0,975	1,025
0,88	0,654	1,131	0,944	0,772	0,796	0,759	0,926	1,151	0,982	0,94
0,64	0,802	1,104	1,113	0,6556	0,81	0,867	1,015	1,06	1,029	0,849
0,814	0,691	1,053	0,896	0,765	0,803	0,707	0,931	0,587	0,937	1,038
1,063	0,833	1,342	0,96	0,764	0,672	0,883	1,033	0,926	0,78	1,043
0,953	0,825	1,292	1,041	0,777	0,751	0,859	1,045	1,171	0,886	0,851
1,05	0,769	0,969	1,178	0,999	0,783	0,744	1,065	0,848	0,817	1,05
1,059	0,96	0,833	0,971	0,814	0,831	0,865	0,943	1,036	0,968	Cfu: 124
1,138	0,825	0,897	0,962	0,77	0,8	0,837	1,153	1,228	0,758	0,91013187
1,107	0,876	1,097	1,051	0,873	0,794	0,75	1,176	1,229	0,799	
1,013	0,879	1,056	1,037	0,804	0,798	0,856	0,893	0,979	Cfu: 145	
0,987	1,009	1,023	1,509	0,926	0,756	0,753	0,994	0,869	0,92356383	
0,962	0,968	1,146	1,165	0,708	0,782	0,598	1,086	1,171		
0,814	1,042	1,008	1,003	0,758	0,803	0,882	1,037	1,06		
0,865	0,966	1,047	0,953	0,863	0,789	0,759	0,883	1,239		
0,987	0,892	1,177	1,103	0,956	0,833	0,803	0,812	1,34		
0,79	0,826	1,333	1,147	1,027	0,768	0,865	1,126	0,836		
0,783	0,92	1,343	1,287	0,919	0,796	0,868	1,047	0,997		
0,909	0,873	1,146	1,145	0,762	0,658	0,666	0,965	1,009		
0,769	0,841	1,092	1,114	0,668	0,783	0,78	0,883	0,903		
0,86	0,782	0,894	0,832	0,737	0,61	0,81	1,123	1,145		
0,825	0,873	1,004	0,869	0,774	0,756	0,873	0,994	1,116		
0,928	0,816	0,817	0,826	0,665	0,631	0,693	0,774	1,274		
0,862	0,645	0,926	0,938	0,779	0,717	0,814	0,876	1,373		
0,708	0,709	1,195	0,792	0,774	0,512	0,814	1,115	0,854		
0,866	0,817	0,816	1,023	0,779	0,725	0,72	0,888	1,157		
0,897	0,747	0,828	1,277	0,854	0,512	0,747	1,028	0,776		
0,731	0,889	0,853	1,135	0,887	0,653	0,783	0,929	1,122		
0,796	0,867	0,878	1,233	0,692	0,738	0,781	1,146	0,882		
0,894	0,706	1,141	1,046	0,692	0,727	0,677	1,17	1,22		
0,891	0,785	1,216	0,984	0,693	0,705	0,822	0,964	1,015		
0,774	0,873	1,443	0,914	0,785	0,779	0,817	1,084	1,076		
0,754	0,724	1,244	Cfu: 142	0,771	0,704	0,927	0,88	0,894		

0,906	0,723	1,188		0,873	0,756	0,748	0,582	1,034
0,867	0,761	1,177		0,848	0,701	0,866	0,933	0,997
0,729	0,788	Cfu: 166		1,027	0,73	0,774	0,84	1,17
0,728	0,994			Cfu: 122	0,79	0,802	0,8	0,814
Cfu: 151	0,944				0,757	0,799	1,134	1,26
	0,929				0,715	0,861	Cfu: 140	0,839
	0,796				0,715	0,699		1,056
	0,826				0,863	0,852		Cfu: 159
	1,068				0,854	0,847		
	0,862				0,832	0,777		
	0,96				0,92	0,856		
	0,988				0,554	0,911		
	0,648				0,704	0,897		
	0,596				0,7	0,776		
	1,102				0,678	0,93		
	0,83				0,674	0,799		
	0,822				0,842	0,844		
	0,92				0,81	0,814		
	Cfu: 188				0,674	0,825		
					0,762	0,913		
					0,739	0,828		
					0,807	0,603		
					0,832	0,741		
					0,693	0,775		
					0,82	0,754		
					0,82	0,913		
					0,566	0,84		
					0,738	0,754		
					0,745	0,722		
					0,41	0,837		
					0,788	0,656		
					0,829	0,778		
					0,856	0,814		
					0,478	0,837		
					0,807	Cfu: 165		
				Cfu: 211				

Tabell A11: Kolonidiameteren til 9758 dyrket på BA 2% NaCl

				Luft:		CO2:		Luft:		CO2:	
				2% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	2% NaCl	2% NaCl
0,606	0,503	0,466	0,561	0,587	0,327	0,62	0,617	0,423	0,543		0,501
0,676	0,558	0,619	0,757	0,506	0,452	0,571	0,623	0,434	0,447		0,489
0,596	0,544	0,575	0,538	0,485	0,669	0,588	0,522	0,463	0,554		0,603
0,573	0,524	0,492	0,582	0,47	0,593	0,633	0,531	0,435	0,543		0,631
0,61	0,604	0,575	0,596	0,546	0,601	0,676	0,589	0,467	0,459		0,501
0,52	0,574	0,499	0,448	0,408	0,546	0,683	0,516	0,418	0,397		0,463
0,593	0,642	0,457	0,508	0,554	0,463	0,692	0,483	0,229	0,522		0,623
0,513	0,54	0,622	0,561	0,465	0,608	0,602	0,567	0,317	0,484		0,678
0,61	0,52	0,507	0,484	0,524	0,578	0,757	0,715	0,351	0,524		0,684
0,648	0,465	0,482	0,408	0,533	0,55	0,705	0,499	0,518	0,508		0,631
0,554	0,551	0,51	0,526	0,544	0,601	0,631	0,707	0,53	0,531		0,669
0,478	0,489	0,532	0,533	0,527	0,536	0,551	0,499	0,392	0,569		0,576
0,502	0,438	0,458	0,551	0,371	0,511	0,749	0,678	0,558	0,61		0,419
0,406	0,463	0,682	0,527	0,448	0,598	0,602	0,644	0,426	0,485	Cfu: ca 500	
0,416	0,553	0,603	0,598	0,569	0,425	0,568	0,644	0,573	0,492		
0,446	0,492	0,484	0,625	0,525	0,503	0,691	0,615	0,48	0,557		
0,54	0,484	0,697	0,502	0,57	0,492	0,551	0,574	0,585	0,55		
0,409	0,593	0,519	0,62	0,577	0,55	0,517	0,608	0,647	0,501		
0,478	0,465	0,605	0,68	0,554	0,527	0,551	0,693	0,418	0,515		
0,502	0,344	0,582	0,585	0,474	0,441	0,57	0,554	0,533	0,568		
0,406	0,477	0,637	0,457	0,5	0,416	0,693	0,713	0,415	0,616		
0,416	0,267	0,573	0,657	0,459	0,433	0,636	0,647	0,361	0,477		
0,446	0,425	0,495	0,585	0,441	0,576	0,636	0,649	0,533	0,516		
0,409	0,522	0,473	0,644	0,631	0,58	0,585	0,602	0,415	0,454		
0,484	0,586	0,542	0,702	0,384	0,506	0,54	0,642	0,418	0,538		
0,419	0,392	0,502	0,709	0,501	0,664	0,7	0,732	0,438	0,523		
0,722	0,399	0,555	0,608	0,587	0,501	0,631	0,712	0,431	0,517		
0,597	0,516	0,544	0,601	0,534	0,492	0,636	0,644	0,546	0,509		
0,492	0,483	0,604	0,52	0,418	0,37	0,755	0,664	0,568	0,522		
0,327	0,567	0,547	0,585	0,596	0,476	0,842	0,642	0,317	Cfu: ca 500		
0,45	0,465	0,696	0,632	0,537	0,365	0,674	0,588	0,229			
0,515	0,589	0,543	0,511	0,369	0,256	0,796	0,537	0,573			
0,438	0,544	0,59	0,56	0,469	0,612	0,556	0,633	0,508			
0,503	0,538	0,616	0,58	0,297	0,557	0,562	0,56	0,317			
0,506	0,503	0,54	0,614	0,377	0,601	0,537	0,726	0,486			
0,601	0,425	0,717	0,52	0,416	0,434	0,585	0,586	0,489			
0,516	0,534	0,592	0,608	0,476	0,465	0,554	0,771	0,525			
0,506	0,467	0,561	0,401	0,495	0,515	0,636	0,758	0,48			
0,489	0,492	0,55	0,571	0,458	0,549	0,483	0,561	0,585			
0,634	0,557	0,596	0,508	0,483	0,653	0,486	0,685	0,585			
0,501	0,483	0,547	0,638	0,54	0,587	0,535	0,511				
0,544	0,354	0,623	0,517	0,501	0,533	0,568	0,476	Cfu: ca 500			
0,597	0,384	0,658	0,56	0,492	0,553	0,571	455				
0,524	0,465	0,523	0,589	0,489	0,499	0,603	0,501				
0,535	0,463	0,636	0,723	0,388	0,416	0,55	0,742				
0,522	0,492	0,528	0,664	0,438	0,464	0,582	0,661				
0,662	0,474	0,556	0,597	0,452	0,553	0,593	0,419				
0,606	0,478	0,609	0,56	0,468	0,499	0,644	0,598				
0,672	0,483	0,658	0,688	0,382	0,339	0,658	0,603				
0,527	0,465	0,459	0,712	0,382	0,392	0,611	0,582				
0,476	0,4	0,577	0,644	0,413	0,639	Cfu: ca 500	0,524				
0,492	0,604	0,572	0,531	0,447	0,486	0,5919009	0,64				
0,409	0,522	0,567	0,642	0,553	0,518		0,625				
0,452	0,267	0,642	0,62	0,397	0,5		0,655				
0,5	0,661	0,588	0,601	0,554	0,638		0,631				
0,538	0,553	0,561	0,602								
0,354	0,423	0,616	0,588								
0,459	0,517	0,632	0,578								
0,566	0,523	0,658	0,55								
0,549	0,484	0,524	0,661								
0,501	0,506	0,582	0,566								

Appendix II

I Appendix II viser tabellene vekten i kDa til de ulike proteinene som er skilt ved SDS-PAGE gel elektroforese. Bio Rad ChemiDoc™ XRS+ Image System ble brukt til å regne ut proteinenes molekylærvækt.

Tabell A2.1: Tabellen viser molekylærvekten (kDa) for isolat 9100 dyrket på CHAB, BA 2% NaCl under CO₂ anriket atmosfære og luft ved tre ulike elektroforeser (Figur 12-14)

Figur 12			Figur 13			Figur 14	
CHAB			CHAB			CHAB:	
Brønn 2	Brønn 3		Brønn 8	Brønn 9		Brønn 2	Brønn 3
kDA	kDA		kDA	kDA		kDA	kDA
92,2	87,4		88,6	92,7		96	93,6
74,6	71,6		73,1	75,6		79,4	78,1
41,7	65,9		67,1	69,2		71	70,2
35	61,8		62,5	64,4		66,8	66,5
31,2	45,7		54,2	55,9		58,6	58,3
28,4	40,1		48,3	49,6		44,1	43,9
25,8	33,5		41,3	42,4		39,6	39,4
23,4	29,9		38	39,2		36,6	36,4
21,9	27,4		34,4	35,3		32,9	32,7
20,7	24,7		30,5	31,8		27,1	26,8
18,9	22,3		28,2	31,3		25,1	24,9
15,6	20,2		25,3	29,1		23,4	21,2
15	18,1		23	26,4		21,6	16,1
15	15		19,9	24		16,3	15
	15		15,1	21,1		15	15
			15	15,9			
				15			
Figur 12			Figur 13			Figur 14	
BA 2% NaCl luft			BA 2% NaCl luft			BA 2% NaCl luft	
Brønn 5	Brønn 6		Brønn 5	Brønn 6		Brønn 5	Brønn 6
kDA	kDA		kDA	kDA		kDA	kDA
85,1	85,1		86,6	87,3		96,8	100
72	71,6		72,4	73,1		81,4	83,5
40,3	40,1		62,5	63,1		68,7	69,8
33,9	33,5		41,6	42		45,4	47,9
29,5	29,3		34,5	35		37,9	46
27,3	27,3		30,8	31,1		33,8	38,3
24,7	24,6		28,3	28,6		31,1	34,3
22	21,9		25,3	25,5		27,8	31,6
20,6	20,5		23	23,2		25,8	28,2
15	15		15	15		15	26,2
							15
Figur 12			Figur 13			Figur 14	
BA 2% NaCl CO ₂			BA 2% NaCl CO ₂			BA 2% NaCl CO ₂	
Brønn 8	Brønn 9		Brønn 2	Brønn 3		Brønn 8	Brønn 9
kDA	kDA		kDA	kDA		kDA	kDA
87,4	91,4		80,9	81,5		100	104,1
72,4	75		69,2	69,2		84,1	87
41,1	41,5		59,4	59,4		69,8	71,4
33,7	36,8		49,1	39,5		45,8	46,7
31,2	32,7		46,2	35,8		38,3	39,2
29,9	31		39,5	32,7		34,1	35,2
25	25,9		35,2	29,2		31,4	32,2
22,7	23,8		32,7	27		28,1	29
21,4	22,4		29,2	24,1		26,2	27
15	15		27	21,8		15,5	16,1
15	15		24,2	15			
15	15		22				
			15				