

Salmonella í umhverfinu



Heiður Loftsdóttir

Líf- og umhverfisvíssindadeild
Háskóli Íslands
2010

Salmonella í umhverfinu

Nemandi:
Heiður Loftsdóttir

10 eininga rannsóknarverkefni til B.Sc. prófs í
líffræði.

Leiðbeinandi:
Guðni Á. Alfreðsson

Líf- og umhverfisvíssindadeild
verkfræði- og náttúruvísindasvið
Háskóli Íslands
Reykjavík, maí 2010

Ágrip

Salmonella tegundir geta verið hættulegir sýklar í umhverfinu, bæði fyrir menn og dýr. Margar rannsóknir hafa sýnt fram á tilvist *Salmonella* í umhverfinu, bæði í sjó, ferskvatni, jarðvegi og villtum dýrum og oft á tíðum geta sýkingar sem rekja má til umhverfisins haft alvarlegar afleiðingar. Markmið þessarar rannsóknar var að kanna tilvist *Salmonella* í umhverfi á höfuðborgarsvæðinu. Tekin voru umhverfissýni á tímabilinu 12. apríl til 3. Maí 2010 á fimm stöðum, þ.e. við Kópavogstjörn, Reykjarvíkurtjörn, í síki við náttúrufræðihúsið Öskju, við ströndina í Skerjafirði og í skólprásarkerfi í skólphreinsistöðinni við Klettagarða. Sýnin voru vatnssýni, fugladritsýni og sandsýni af ströndinni. Til þess að reyna að athuga tilvist *Salmonella* voru notaðar hefðbundnar greiningaraðferðir. Fyrst voru sýni látin í forræktun í bufferað peptón vatn, síðan voru sýni úr forræktunum látin í auðgunarætin Rappaport-Vassiliadis Soya og Tetrathionate Broth Base. Úr þeim var síðan strikað á sérhæfðu agarætin Brilliant green agar (modified) og XLD agar bæði við 24 klst. og 48 klst. Selenite cystine broth auðgunaræti var einnig notað fyrir skólpssýnin. Líklegar *Salmonella* kólóníur voru valdar m.t.t. útlitseinkenna og lífefnafræðilegar prófanir gerðar á þeim. Þau voru ureasa próf á urea agar, TSI próf og LIA próf ásamt því að API 20E fjölpróf voru notuð til staðfestingar. Niðurstöður urðu þær að *Salmonella* einangraðist aðeins úr 5 sýnum sem tekin voru tvívar sinnum úr skólphreinsistöðinni en úr engum öðrum umhverfissýnum. Þetta bendir til þess að aðrir sýnatökustaðir hafi verið lausir við *Salmonella* og eins fuglarnir sem drít var tekið frá, a.m.k. á þeim tíma sem þessi sýni voru tekin. Þó er ekki hægt að staðhæfa um það en fróðlegt væri að gera aðra rannsókn með meiri sýnafjölda og jafnvel að sumri til.

Abstract

Salmonella species can be dangerous environmental pathogens both for men and animals. Scientists have shown that *Salmonella* can be found in environmental sources such as seawater, freshwater, soil and wild animals. Infections that may be traced to the environment can often have severe consequences. The aim of this research was to detect the presence of *Salmonella* in several locations in the Reykjavík area. Samples were collected from five locations from April 12th to May 3rd 2010. These locations were Kópavogstjörn, Reykjarvíkurtjörn, a ditch near the University building Askja, the beach at Skerjafjörður and a sewage processing plant at Klettagarðar, Reykjavík. Samples collected were water samples, bird droppings and sand samples. For the detection of *Salmonella* we used traditional cultural techniques. Samples were pre-enriched in buffered peptone water, then cultured in Rappaport-Vassiliadis Soya and Tetrathionate Broth Base enrichment media and finally plated on Brilliant green agar (modified) and XLD agar. Plating took place both at 24 hours and 48 hours. Selenite Cystine Broth enrichment was also used for the sewage samples. Colonies with *Salmonella*-like characters were picked for biochemical testing. These test were done on urea agar, TSI agar and LIA agar and the API 20E kit was also used. *Salmonella* was only detected in five samples taken from the sewage system but other samples were negative. This suggests that the sampling locations were possibly *Salmonella* free and so were the bird droppings collected. Still, it is difficult to assert anything on this matter and it would be interesting to perform another research project with more samples and in the summer time.

Efnisyfirlit

	<u>Bls</u>
Efnisyfirlit	iii
Myndaskrá	iv
Töfluskrá	iv
1. Inngangur	1
1.1 <i>Enterobacteriaceae</i> og <i>Salmonella</i>	1
1.2 <i>Salmonella</i> : dreifing og sýkingar	1
1.3 Aðferðir við einangrun og greiningu <i>Salmonella</i>	4
1.3.1 Hefðbundnar greiningaraðferðir	4
1.3.2 Aðrar greiningaraðferðir	7
1.4 Rannsókn á <i>Salmonella</i> í umhverfinu	9
2. Efni og aðferðir	10
2.1 Sýnatökustaðir	10
2.2 Sýnataka og meðhöndlun sýna	10
2.3 Forræktun og auðgunarræktun („enrichment” ræktun)	11
2.3.1 Forræktunaræti	11
2.3.2 Sértaek auðgunaræti („enrichment ætti”)	11
2.4 Ræktun á sérhæfðum agarætum	12
2.5 Einangrun og val <i>Salmonella</i> líkra kólónía	13
2.6 Lífefnafræðileg greiningarpróf	13
2.6.1 Forpróf	13
2.6.2 API 20E fjölpróf	14
3. Niðurstöður	15
3.1 Ræktun á sérhæfðum agarætum	15
3.2 Lífefnafræðileg greiningarpróf	16
4. Umræður	20
5. Heimildaskrá	22
Viðauki 1: kort af sýnatökustöðum	25

Myndaskrá

	<u>Bls</u>
Mynd 1. Hringrás <i>Salmonella</i> .	2
Mynd 2. Uppljómun á <i>Salmonella</i> með hjálp <i>lux</i> gena bakteríuveiru	7
Mynd 3. Fyrstu stig ræktunar <i>Salmonella</i>	12
Mynd 4. Ureasa neikvæður Urea agar og Ureasa jákvæður Urea agar	16
Mynd 5. TSI agar	18
Mynd 6. LIA agar	18
Mynd 7. API 20E greiningarpróf	18
Mynd 8. Niðurstöðublað API 20E prófs	19
Mynd 9. Kópavogstjörn	25
Mynd 10. Tjörnin í Reykjavík	26
Mynd 11. Síki við Öskju, náttúrufræðihús	27
Mynd 12. Ströndin við Skerjafjörð	28
Mynd 13. Skólphreinsistöðin við Klettagarða	29
Mynd 14. Inni í skólphreinsistöðinni	30

Töfluskrá

	<u>Bls</u>
Tafla 1. Útstrikkun rækta á næringaragar.	15
Tafla 2. Ureasa virkni í Urea agar eftir sáningu með líklegum <i>Salmonella</i> .	16
Tafla 3. Litabreytingar í TSI og LIA agar eftir sáningu með líklegum <i>Salmonella</i> .	17

1. Inngangur

1.1 *Enterobacteriaceae* og *Salmonella*

Salmonella ættkvíslin tilheyrir *Enterobacteriaceae* ættinni. Bakteríur í *Enterobacteriaceae* ættinni eru kjörfrjálsar m.t.t. súrefnis (facultative anaerobes) og chemoorganotrophar, staflaga, Gram neikvæðar bakteríur. Þær eru annað hvort hreyfanlegar með jafndreifðum (peritrichous) svipum eða þá að þær eru óhreyfanlegar. Flestar tegundir vaxa vel við 37°C. D-glúkósa og öðrum sykrum er sundrað með myndun sýru og í mörgum tegundum einnig með myndun gass. Bakteríur í þessari ætt finnast út um allan heim, í jarðvegi, vötnum, ávöxtum, grænmeti, korni, plöntum og dýrum allt frá skordýrum til manna. Margar tegundir valda niðurgangssjúkdómum (*Bakteríufræði* 2007:67).

Salmonella bakteríur eru dæmigerðir meðlimir *Enterobacteriaceae* ættarinnar, kjörfrjálsir Gram neikvæðir stafir sem geta vaxið á margvíslegum ætum. *Salmonella* greinist frá öðrum meðlimum ættarinnar eftir lísefnafræðilegum eiginleikum og byggingu mótefnavaka á yfirborði þeirra (einkum í vegg og á svipum) (*Bakteríufræði* 2007:117).

Salmonella ættkvíslin hefur tvær tegundir. Það eru 1) *Salmonella enterica* sem skiptist í sex undirtegundir og 2) *Salmonella bongori* sem áður var flokkuð sem undirtegund *S. enterica* (NN, 2001). Vel yfir 2000 serótýpur eru til af *Salmonella* en hægt er að greina þær í serótýpur með því að skoða mótefnavaka þeirra, O-mótefnavaka (í vegg) og H-mótefnavaka (í svipu) (*Bakteríufræði* 2007:118).

1.2 *Salmonella*: dreifing og sýkingar

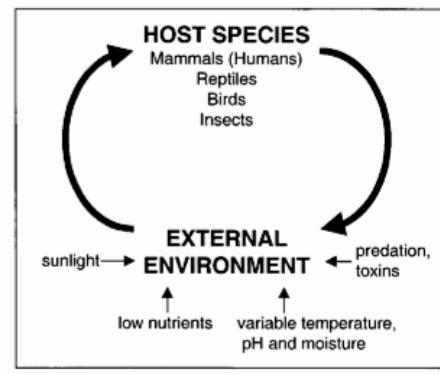
Oftast er talað um sýkingar af völdum *Salmonella* sem matarsýkingar og í flestum tilfellum er þá um að ræða neyslu á *Salmonella* menguðum matvælum, einkum dýraafurðum eins og nautakjöti, eggjum, alifuglum og mjólkurvörum. Saurmengað grænmeti og ávextir geta líka valdið *Salmonella* sýkingum. Í Bandaríkjjunum er áætlað að um 1,4 milljón tilfelli matarsýkinga á ári séu af völdum (nontyphoidal) *Salmonella*. Aðeins eru um 30.000-40.000 tilfelli staðfest með greiningu en talið er að staðfestu tilfelliin séu einungis 1%-5% af heildartilfellum *Salmonella* sýkinga (Voetsch o.fl., 2004). Eins er hægt að sýkjast af *Salmonella* með því að innbyrða mengað drykkjarvatn en það er þó sjaldgæfara en matvælasýkingar. *Salmonella* getur auk þessa smitast í menn með snertingu við dýr sem bera bakteríuna í sér ef ekki

er gætt nægilega vel að handþvotti (Crum-Cianflone, 2008). Hér á Íslandi hefur til dæmis innflutningur á skriðýrum á borð við slöngur, eðlur og skjaldbökur verið bannaður frá því snemma á 9. áratug síðustu aldar vegna þess að upp komu alvarleg sjúkdómstilfelli af völdum *Salmonella* sem mátti rekja til þessara dýra (Matvælastofnun, 2009).

Aðal heimkynni *Salmonella* eru þarmar dýra en *Salmonella* er gædd erfðafræðilegum þáttum sem hjálpa henni að lifa af við þær aðstæður. Umhverfi hýsilsins hefur þá kosti fyrir *Salmonella* að þar er hlýtt og stöðugt hitastig og eins er þar hátt hlutfall af amínósýrum og sykrum sem stuðla að góðum vexti baktería. Þegar *Salmonella* er skilin út úr líkama hýsils þarf hún að berjast fyrir lífi sínu við gjörbreyttar aðstæður. Þá kljást bakteríurnar við skort á næringu, osmósustress og breytileika í hitastigi og pH svo eitthvað sé nefnt. Til þess að lifa af þessar aðstæður fara bakteríurnar í svokallað VBNC (viable but nonculturable) ástand en þá eru þær lifandi en ná ekki að fjölga sér. Um leið og þær komast úr þessu ástandi geta þær fjölgað sér aftur (Winfield og Groisman, 2003).

Eðli *Salmonella* gerir það að verkum að lífstíll hennar getur verið nokkurs konar hringrás þar sem hún fer í gegnum hýsil og síðan út í umhverfið og þaðan aftur í nýjan hýsil(sjá mynd1). Þekkt eru dæmi um að mengaður skítur frá dýrum sé notaður sem áburður á tunn en *Salmonella* getur ræktast úr slíkum áburði í allt að 21 dag eftir að honum er dreift. Þegar dýrin éta síðan grasið geta þau sýkst aftur af *Salmonella* og þannig viðhelst hringrásin (Winfield og Groisman, 2003).

Fuglar og flugur geta komið við sögu í útbreiðslu á *Salmonella*. Ef þessi dýr eru smitberar getur mengun orðið víða í umhverfinu og einnig á stöðum eins og kjúklingabúum og í fjósum þar sem auðvelt er fyrir flugur að komast inn (Winfield og Groisman, 2003). *Salmonella* hefur oft á tíðum greinst úr villtum fuglum. Fuglar geta smitast eftir ýmsum leiðum en sú augljósasta er þegar ránfuglar nærast á *Salmonella* sýktri bráð. Ránfuglar eru þó ekki einu fuglarnir sem geta sýkst og borið *Salmonella*. Hræætur eins og hrægammar, krákur og mávar eiga einnig á hættu að sýkjast og þá sérstaklega mávar, þar sem þeir nærast oft á stöðum þar sem skólpi er veitt út í umhverfið. Mávar virðast einnig vera nokkuð þolnir gagnvart sjúkdómum af



Mynd 1. Hringrás *Salmonella* (Winfield og Groisman, 2003).

völdum *Salmonella* en geta aftur á móti verið hættulegir smitberar. Aðrir fuglar eins og dýfur og vatnafuglar geta smitast af *Salmonella* menguðu umhverfi (Tizard, 2004). Í Noregi er *Salmonella* Typhimurium orðinn landlægur sýkill í fuglum og á árunum 1969-2000 voru staðfest 469 tilfelli af *Salmonella* Typhimurium sem voru greind úr 26 tegundum fugla. Flestir sýktu fuglanna voru dómpápar (*Pyrrhula pyrrhula*) en aðrar tegundir voru til dæmis auðnutittlingur (*Carduelis flammea*), evrópskur þrostur (*Erithacus rubecula*) og kanadísk gæs (*Branta canadensis*) (Refsum o.fl., 2002).

Salmonella hefur oft á tíðum verið einangruð úr vatni en það getur verið milliliður í sýkingum milli hýsla. Margir telja að ferskt vatn sem rennur til að mynda á fjöllum sé algjörlega tært og ómengað en rannsóknir hafa sýnt fram á að *Salmonella* getur verið þar til staðar og menn hafa sagt að hvergi sé til náttúrulegt drykkjarhæft yfirborðsvatn (Cherry o.fl., 1972). Miðað við aðrar bakteríur hefur *Salmonella* háa lifunartíðni í vatnsumhverfi. Í sjó skipta árstíðir ekki máli varðandi það hvort *Salmonella* sé til staðar eða ekki og heldur ekki hitastig. *Salmonella* virðist þola vítt álag af áreiti af völdum breytileika í umhverfi og getur verið til staðar í vatnsumhverfi í nokkurn tíma. Eins má finna *Salmonella* í botnfalli vatns sem og í jarðvegi (Winfield og Groisman, 2003). Í heitum löndum eins og á Spáni eru oft gerðar rannsóknir á tilvist *Salmonella* í sjó, þar sem menn eru í mikilli snertingu við sjóinn á baðströndum. Í rannsókn sem gerð var á Norður-Spáni á árunum 1992-1996 voru tekin vatnssýni við 214 stendur. Þar greindust 42 serótýpur af *Salmonella* úr sjósýnum og þær serótýpur sem voru algengastar voru þær sömu og eru oftast greindar úr klínískum tilfellum. Þetta bendir til þess að ein aðal orsök *Salmonella* mengunar í sjó stafi af menguðu skólpi frá mönnum sem veitt er í sjóinn (Polo o.fl., 1999).

Yfirborðsvatn mengað af *Salmonella* bakteríum getur verið mjög varasamt fyrir dýr og menn og til eru þó nokkur dæmi um hópsýkingar vegna neyslu á menguðu vatni. Eitt alvarlegt dæmi um slíka sýkingu er frá Bandaríkjunum þar sem að minnsta kosti 650 tilfelli urðu af niðurgangi, 15 þurftu að leggjast inn á spítala og 7 manneskjur dóu af völdum *Salmonella* sýkingar úr menguðu drykkjarvatni. Sýkingin varð í borginni Gideon í Missouri árið 1993 og eftir rannsókn kom í ljós að upptök hennar voru í 100.000 gallona vatnsgeymslutanki. Í þessum tanki var opin loftlúga sem leyfði aðgang villtra fugla og talið er að með driti þeirra hafi *Salmonella* borist í drykkjarvatn íbúanna (Angulo o.fl., 1997). Mennirnir eru alls ekki einu dýrin sem eiga á hættu að fá *Salmonella* sýkingu. Hér lendis hafa nokkrum sinnum komið upp

alvarlegar sýkingar af völdum *Salmonella* Typhimurium í hrossum en þau virðast vera óvenju viðkvæm fyrir þessri típu *Salmonella*. Mjög alvarlegt tilfelli varð sumarið 1989 í Rangárvallasýslu þar sem rúmlega 50 hestar á 7 bæjum drápus af völdum *Salmonella* Typhimurium sýkingar. Við rannsókn kom í ljós að mikil mengun var í bithaga og í vatnsbólum hestanna og talið er að mengunin hafi verið af völdum fugla. Mávar og hrafnar á svæðinu voru með mjög háa smittíðni eða 66% og 68%. Árið 2008 varð önnur mjög alvarleg hópsýking hesta í Norðurgróf við Esjurætur þar sem 27 af 44 hestum á bænum drápus af völdum *Salmonella*. Bakterían fannst í settjörnum sem hestarnir nýttu sem vatnsból, í heyi og í saursýnum hestanna í haga og var umhverfi þeirra því mjög mengað. Talið er að annaðhvort hafi verið um mengun af völdum fugla að ræða eða þá að einhver hesturinn hafi verið dulinn smitberi. Við ákveðnar aðstæður getur sýking blossað upp vegna streitu í dulnum smitberum og þannig geta hestarnir mengað umhverfið og aðrir hestar sýkst (Eggert Gunnarsson o.fl., 2009).

1.3 Aðferðir við einangrun og greiningu *Salmonella*

Eins og gefur að skilja er fjöldi og fjölbreytileiki baktería í umhverfinu mjög mikill og því þarf mismunandi aðferðir til að einangra og greina þær. *Salmonella* hefur verið mikið rannsokuð og eru til margar mismunandi aðferðir til einangrunar og greiningar á henni.

Bakteríur eru sjaldan jafndreifðar í umhverfinu og þar af leiðandi þarf að passa upp á sýnafjölda og sýnastærð. Almennt gildir að því stærra sýni sem er rannsakað, þeim mun meiri líkur eru á að einangrun takist á þeirri bakteríu sem reynt er að finna. Varasamt er þó að taka of stór sýni þar sem það getur valdið vandræðum í forræktun ef of mikið af öðrum bakteríum eða skaðlegum efnum er til staðar (Fricker, 1987).

1.3.1 Hefðbundnar greiningaraðferðir

Til einangrunar á bakteríum úr vatni er algengt að nota bómullargrisjur eða vöndla sem kallast „Moore swabs”. Þessi aðferð er kennd við Moore sem árið 1948 kynnti þessar grisjur til sögunnar en hann setti þá bómullargrisjur í skólp og einangraði úr þeim *Salmonella* (Barrett o.fl., 1980). Grisjurnar hafa verið notaðar í öðru vatni en skólpi og til dæmis var *Salmonella* einangruð úr áveisuvatni í Santiago í Chile þar sem taugaveiki (e. typhoid fever) var mikið heilsufarsvandamál (Sears o.fl., 1984).

Mikilvægt er að rennsli sé í vatninu þ.e. að það sé ekki kyrrstætt þegar notaðir eru grisjuvöndlar.

Ákveðinn ferill er oftast notaður til einangrunar á bakteríum, t.d. *Salmonella*, úr matar- eða umhverfissýnum:

- 1) Endurlífgun/forræktun (pre-enrichment)
- 2) Auðgunarræktun (enrichment) í fljótandi æti
- 3) Einangrun á kólóníum á sérstökum agarætum
- 4) Staðfesting á tegund bakteríu með formfræðilegum athugunum, lífefnafræðilegum eða lífeðlisfræðilegum prófunum, eða með greiningu á serótýpum. (Fricker, 1987)

Forræktunaræti skapa hagstæð skilyrði fyrir fjölgun flestra baktería og frumur sem hafa laskast t.d. vegna frystingar, kælingar eða þurkkunar fá tækifæri til þess að lifa af og fjölga sér. Mest notaða forræktunarætið fyrir *Salmonella* er bufferað peptón vatn (BPV) en sýnt hefur verið fram á notagildi þess með fjöldamörgum rannsóknum (Fricker, 1987). Árið 1977 sýndu Berenice M. Thomason og samstarfsmenn hans til að mynda fram á það að með notkun bufferaðs peptón vatns jukust heimtur á *Salmonella* úr sýni um u.þ.b. 25%. Af 162 sýnum úr jarðvegi og vatni greindist *Salmonella* í 37 þeirra þegar forræktað var í BPV og síðan í tetrathionate. Sýni sem voru forræktuð í bufferuðu peptón vatni gáfu af sér 34 *Salmonella* jákvæð sýni. Sýni sem voru sett beint í tetrathionate auðgunaræti gáfu af sér 27 jákvæð sýni og sýni sem voru forræktuð í lactose broth gáfu einungis af sér 26 jákvæði *Salmonella* sýni. (Thomason o.fl., 1977). Bufferað peptón vatn er notað í stöðluðum aðferðum (ISO 6579:2002) til einangrunar á *Salmonella* (NN, 2002).

Auðgunaræti eða „enrichment” æti eru til þess gerð að ákveðnar gerðir baktería vaxi betur en aðrar þannig að sú gerð verði í mestu magni. Til eru tvær aðferðir við auðgunarræktun. Auðgunaræti geta verið val (elective) auðgunaræti eða sértæk (selective) auðgunaræti. Val auðgunaræti hafa eiginleika sem leyfa einstaka eða fáum tegundum baktería að vaxa. Sértæk auðgunaræti hafa eiginleika sem hamla vexti ákveðinna tegunda en leyfa þeirri tegund sem reynt er að einangra að vaxa. Margar tegundir af auðgunarætum eru til fyrir einangrun á *Salmonella* og fer val á því hvaða æti skal notað eftir því hvernig sýnið er og hvaða gerðir *Salmonella* er líklegt að séu til staðar. Sem dæmi um auðgunaræti má nefna Selenite cysteine broth, Tetrathionate broth og Rappaport Vassiliadis æti (Fricker 1987).

Agaræti sem valin eru til ræktunar á bakteríum úr auðgunarætum þurfa að hafa ákveðna eiginleika. Á þeim þurfa að geta vaxið allar gerðir þeirrar bakteríu sem leitað er að og ef hægt er skal aetið hafa eiginleika sem hindra vöxt annarra baktería. Bakteríur sem vaxa upp á ætinu ættu líka að hafa ólíkt útlit þannig að auðvelt sé að greina eina gerð frá annarri og minna verði af óþörfum lífefnafræðilegum prófunum. Fyrir ræktun á *Salmonella* eru til mörg sérhæfð agaræti. Sem dæmi má nefna Brilliant green agar, MacConkey agar og XLD agar (Fricker, 1987).

Til þess að staðfesta að kólóníur sem vaxa á sérhæfðum agarætum og líta út fyrir að vera *Salmonella* séu raunverulega *Salmonella* er nauðsynlegt að framkvæma lífefnafræðileg próf. Til staðfestingar eru notaðir Urea skáagar, TSI skáagar og LIA skáagar. Urea skáagar hefur þvagefni (urea) sem gefur bleikan lit vegna basískra efna sem myndast við niðurbrot. *Salmonella* hefur ekki ureasa þannig að aetið verður örlitið gult (súrt vegna glúkósa gerjunar). TSI skáagar eða Triple sugar iron agar inniheldur þrjár sykrur; laktósa, súkrósa og dextrósa. *Salmonella* gerjar dextrósuna en ekki hinar sykrurnar og þ.a.l. fær botninn gulan lit en yfirborðið verður rauðt. Einnig myndast gas vegna gerjunarinnar og H₂S myndun verður vegna niðurbrots amínósýra sem innihalda brennistein og H₂S hvarfast við járn citrat sem er til staðar í ætinu og gefur svarta útfellingu af FeS. LIA skáagar inniheldur sykruna glúkósa og amínósýruna L-lýsín. Bakteríur sem mynda lýsín decarboxylasa valda basísku hvarfi í öllu ætinu sem gefur fjólbláan lit. Hjá þeim bakteríum sem ekki geta decarboxylerað lýsín myndast basíkur halli (fjólblár) en súr botn (gulur vegna gerjunar glúkósa). Einnig getur orðið útfelling á FeS þegar H₂S hvarfast við ferric ammonium citrat í ætinu en þá myndast svört útfelling. *Salmonella* bakteríur geta myndað lýsín decarboxylasa og einnig verður útfelling á FeS (Bridson, 1995).

API 20E er staðlað próf fyrir *Enterobacteriaceae* ættina. Ein API 20E ræma (strip) samanstendur af 20 litlum túbum sem innihalda þurrkuð hvarfefni. Mikilvægt er að nota hreina bakteríurækt. Bakteríurækt er leyst upp í dauðhreinsuðu eimuðu vatni og lausninni bætt í hvert hólf samkvæmt leiðbeiningum. Ræmurnar eru síðan settar í hitaskáp við 36±2°C í 18-24 klst. en þar verða efnaskipti sem valda litabreytingum annaðhvort ósjálfrátt eða eftir að „reagentum” hefur verið bætt við. Sem dæmi um það sem er prófað má nefna H₂S myndun, framleiðslu á indóli, ureasa virkni og gerjun á ýmsum sykrum (NN, 2004).

1.3.2 Aðrar greiningaraðferðir

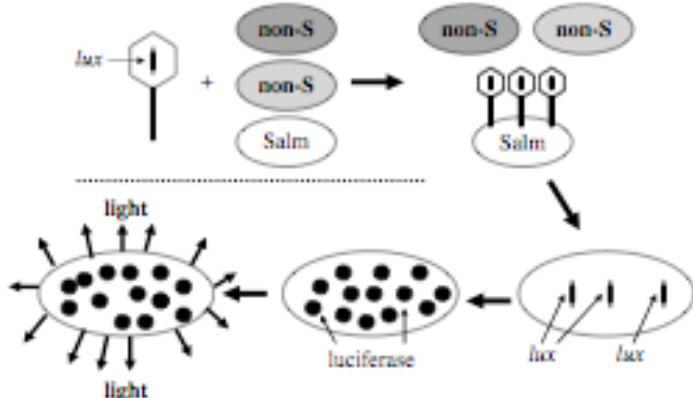
Hefðbundnar greiningar aðferðir með ræktunum eins og lýst hefur verið eru tímafrekar enda þarf ræktun á hverju stigi ákveðinn tíma og oft upp undir sólarhring. Til eru aðrar aðferðir sem taka styttri tíma en þá er ræktunum skipt út fyrir fljótvirkari aðferðir. Þær helstu sem þar eru notaður og fjallað verður um hér eru FA (fluorescent antibody) tækni, Felix O-1 bacteriophage, ónæmissegulaðgreining (immuno-magnetic separations) og PCR (polymerase chain reaction).

Fluorescent antibody eða flúrljómandi mótefnatæknin er þannig að mótefni sem eru sértæk fyrir ákveðna mótefnavaka lífveru eru merkt með flúrljómandi lit. Þegar mótefnin bindast síðan því sem þau eru sértæk fyrir (t.d. ákveðnir þættir *Salmonella*) gefur það frá sér flúrljómun sem hægt er að skoða í flúrljómandi smásjá. Hægt er að fá niðurstöður úr þessu prófi mjög hratt en þó ber að varast niðurstöður þar sem hætta er á víxl-verkun og eins getur FA tækni greint lífveru til staðar þó hún sé ekki lífvænleg (Cooper og Danielson, 1997:228). Þessi aðferð hefur til að mynda verið notuð til þess að greina VBNC *Salmonella* tegundir úr vatnssýnum, jafnvel úr vatnssýnum þar sem klór hafði verið bætt út í (Desmonts o.fl., 1990). FA aðferðir hafa einnig verið bornar saman við hefðbundnar aðferðir varðandi næmni við greiningu á *Salmonella*. Úr rannsókninni sem Cherry og félagar fjalla um í sinni grein kom í ljós að FA próf bentu til *Salmonella* í 63% fleiri tilvikum en hefðbundnar greiningaraðferðir. Af 159 sýnum bentu 145 til þess að *Salmonella* væri til staðar þegar notuð var FA tækni en aðeins 91 jákvæð niðurstaða varð úr hefðbundnum prófunum. Skýringar á þessum mikla mun geta falist í því að aðrar bakteríur hafi hreinlega vaxið yfir *Salmonella* í þeim sýnum sem voru jákvæð í FA en neikvæð í ræktun. Önnur skýring er sú að um hafi verið að ræða falskar jákvæðar niðurstöður fyrir FA prófinu, en þá hefur mótefnið bundist skyldri bakteríu en ekki *Salmonella* (Cherry o.fl., 1972).

Felix O-1 Bacteriophage er bakteríuveira sem sýkir um 98% allra *Salmonella* stofna. Það voru Cherry og samstarfsmenn sem árið 1954 sýndu fyrst fram á hæfileika þessarar veiru til að nema tilvist *Salmonella*. Fjölmargir hafa gert rannsóknir á henni síðan þá og staðfest sértækni hennar. Til að sjá hvort *Salmonella* sé til staðar eða ekki í sýni er bakterían látin þekja agarskál með vexti og síðan er dropi af bakteríuveirunni láttinn ofan á. Ef eyður myndast þá hefur bakteríuveiran brotið niður bakteríuna sem hún er sértæk fyrir. Susan Welkos og samstarfsmenn sýndu fram á að 98,2% *Salmonella* stofna voru brotnir niður með Felix O-1

bakteríuveirunni en aðrar gram neikvæðar bakteríur voru þolnar gagnvart henni, fyrir utan 5,9% af *E.coli* stofnum (Welkos o.fl., 1974). Ýmsar stökkbreytingar hafa verið gerðar á upphaflegu

Felix O-1
bakteríuveirunni. Til að mynda hefur *lux* genum verið komið inn í bakteríuveiruna en vegna þeirra verður hýsilfruman uppljómuð innan 1 klst frá sýkingu (Ulitzur og Ulitzur 2006). Ef engin



Mynd 2. Uppljómun á *Salmonella* með hjálp *lux* gena bakteríuveiru (Kuhn, 2007).

Salmonella er til staðar í sýninu eru *lux* genin ekki tjáð og því verður engin ljómun. Þegar *Salmonella* er til staðar innlimast DNA bakteríuveirunnar í *Salmonella* bakteríurnar og tjáning verður á *lux* genunum. Það verður til þess að nýmyndun verður á luciferasa sem gefur frá sér ljós. Þetta ferli má sjá á mynd 2 (Kuhn, 2007).

Ónæmissegulaðgreining (immuno-magnetic separation) er önnur mikið notuð aðferð til einangrunar á *Salmonella* og öðrum bakteríum. Þá er litlum segulmögnuðum kúlum sem bera mótefni gegn mótefnavökum á ákveðnum bakteríum, t.d. *Salmonella* bætt út í hluta af forræktinni. Ónæmis-segul agnirnar bindast þá frumunum (t.d. *Salmonella*) og notaður er segull til þess að draga þær saman á glasvegginn meðan restin af lausninni er sugin í burtu. Þannig er hægt að einangra sérstakar bakteríur og þar á meðal bakteríur eins og til dæmis *Salmonella* (Safarík o.fl., 1994). Eftir að *Salmonella* hefur verið einangruð með þessum hætti er greiningunni haldið áfram. Lausninni sem eftir er í glasinu er þá til dæmis strikað út á sérhæfð agaræti eða sameindafræðileg próf eru gerð eins og t.d. PCR.

Notkun á PCR tækni hefur aukist mikið undanfarin ár við einangrun og greiningu á bakteríum, þá aðallega úr matar- og sjúkrahússýnum. PCR gengur út á það að DNA er einangrað úr frumum og ákveðnar raðir þess eru síðan magnaðar upp með polymerasa keðjuhvarfi. Til þess að aðgreina DNA sameindirnar er sýnið síðan rafdregið á agarósageli. Með PCR er hægt að fá niðurstöður fljótt og næmni þeirra er mikil þar sem mögnun verður aðeins á DNA sem er einstakt fyrir þær lífverur sem verið er að leita að. PCR tæknin hefur einnig þann kost að hún er óháð því hvort

bakteríur nýti ákveðin efni eða tjái ákveðna mótefnavaka og sniðgengur þannig breytileika innan tegunda. Árið 2003 gerðu Oliveira og félagar rannsókn þar sem þeir báru saman PCR tækni og hefðbundnar aðferðir til einangrunar á *Salmonella*. Þeir skoðuðu einnig hvort væri betra; ræktun í sértæku auðgunaræti (RV, Rappaport-Vasiliadis) eða ósértæku (NS, Non-Selective) áður en gert var PCR. Niðurstöður þessarar rannsóknar voru þær að 33 sýni voru jákvæð fyrir *Salmonella* þegar notað var PCR-RV. 15 jákvæð sýni voru greind með hefðbundum greiningaraðferðum og aðeins 6 jákvæð sýni voru greind með PCR-NS. Öll sýni sem voru jákvæð með PCR-NS og hefðbundum aðferðum voru einnig jákvæð með PCR-RV. Þessar niðurstöður sýna fram á mikilvægi þess að halda í auðgunarræktarskrefið. Í auðgunarræktuninni eykst fjöldi baktería sem eru lífvænlegar og eins þynnast út efni sem geta hindrað PCR. Sértækt auðgunaræti leyfir bakteríunni sem reynt er að einangra að vaxa á meðan öðrum tegundum er haldið niðri og þess vegna verða niðurstöður úr PCR betri (Oliveira o.fl., 2003).

1.4 Rannsókn á *Salmonella* í umhverfinu

Ljóst er að *Salmonella* getur verið hættulegur umhverfissýkill og lifað utan hýsils við erfiðar aðstæður. Því ákvað ég ásamt kennaranum mínum, Guðna Á. Alfreðssyni, að kanna tilvist *Salmonella* í umhverfinu á vissum svæðum á höfuðborgarsvæðinu. Við tókum vatnssýni úr tveimur tjörnum, úr síki sem staðsett er við Öskju og settum niður vöndla í skólprás. Eins tókum við dritsýni úr fuglum og sandsýni úr fjöru. Þessi rannsókn fór fram á tímabilinu 12. apríl til 3. maí. Engin reglubundin vöktun er á tilvist *Salmonella* hér á landi en helst er ráðist í rannsóknir ef upp koma hópsýkingar eins og á Rangárvöllunum þegar 50 hestar drápus af völdum *Salmonella* (Eggert Gunnarsson o.fl., 2009). Þó er fylgst með mengun í tjörnunum tveimur, Kópavogstjörn og Tjörninni í Reykjavík. Í Kópavogslæk (sem rennur í Kópavogstjörn) er fylgst með magni saurkólíbaktería og saurkokka (fecal streptococci) þrisvar á ári, í maí, ágúst og nóvember (Heilbrigðiseftirlit Hafnafjarðar- og Kópavogssvæðis). Árið 2006 var gerð rannsókn á vegum Reykjavíkurborgar til að kanna örveruástand í Tjörninni og kom í ljós umtalsverð mengun af saurkólí- og enterókokkabakteríum og meðal tegunda sem greindust voru *Escherichia coli*, *Campylobacter* tegundir, *Clostridium* tegundir, *Pseudomonas aeruginosa* og *Salmonella typhimurium* (Hilmar J. Malmquist o.fl., 2008).

2. Efni og aðferðir

2.1 Sýnatökustaðir

Sýnatökustaðir voru a) Kópavogstjörn, b) Tjörnin í Reykjavík, c) síki við húsið Öskju í Vatnsmýrinni, d) ströndin við Skerjafjörð og e) skólphreinsistöðin að Klettagörðum í Reykjavík.

- a) Kópavogstjörn er tjörn sem hefur myndast vestast í Kópavogsdal þar sem Kópavogslækur rennur í tjörnina. Úr Kópavogstjörn rennur vatnið út í sjó.
- b) Tjörnin í Reykjavík er staðsett í miðbænum við Ráðhús Reykjavíkur. Vatnið í Tjörninni rennur þangað úr Vatnsmýrinni og úr Tjörninni rennur vatn til sjávar um ræsi undir Lækjargötu (Sigurður Steinþórsson, 2004).
- c) Í Vatnsmýrinni safnast saman vatn í síki sem rennur síðan í Tjörnina. Tekin voru vatnssýni alveg upp við Öskju.
- d) Ströndin við Skerjafjörð, við enda Skeljaness. Ef skólphreinsistöðin getur ekki tekið við skólpi (t.d. vegna rafmagnsbilunar) er því veitt út um yfirlif sem opnast á ströndinni og fer þaðan út í sjó.
- e) Skólphreinsistöðin við Klettagarða tekur við skólpi frá Reykjavík, Seltjarnarnesi, Mosfellsbæ, Kópavogi og Garðabæ („Umfangsmesta áfanga”, 2002)

Kort af sýnatökustöðum má sjá í viðauka 1. Við gerð kortanna var notast við forritið Google Earth og myndvinnsluforritið Paint.

2.2 Sýnataka og meðhöndlun sýna

Sýnatökur við Kópavogstjörn og Reykjavíkurtjörn fóru eins fram. Við hverja sýnatöku voru tekin 5 vatnssýni á mismunandi stöðum (sjá viðauka 1) og 5 fugladritsýni sem fundust við tjarnirnar. Ein sýnataka var við Kópavogstjörn en tvær við Reykjavíkurtjörn. Úr síkinu við Öskju voru tekin 5 vatnssýni.

Vatnssýni voru tekin upp með dauðhareinsuðum plastílátum sem fest voru á stöng og vatnið sett í dauðhareinsaðar 1000 mL flöskur. Farið var með þau strax á rannsóknarstofu og þau látin síast rólega í gegnum síur í Büchner trekt. Síur í Büchner trekt voru útbúnar þannig:

Neðst |Whatman filter pappír nr 1 → himnusía (HAWP 04700, Millipore, gatastærð 0,45 µm) → Trefjasía (mjög þunn) → Gróf grisja → Fín grisja → Þykkt bómullarlag → Trefjasía (þykkari) → Þunnt bómullarlag → Gróf grisja (tvöfalt lag)| Efst

Síurnar voru síðan teknaðar að lokinni síun vatnssýnanna og settar í dauðhreinsaðar krukkur þar sem 225 mL af bufferuðu peptón vatni var hellt yfir þær. Tekin voru 2-5 g af dritsýnum með dauðhreinsuðum spaða og þau sett í dauðhreinsuð 100 mL plastbikara. Á rannsóknarstofu var svo um 50 mL af bufferuðu peptón vatni hellt beint yfir dritið og það leyst aðeins upp með dauðhreinsuðum bómullarpinna.

Tekin voru 5 g af sandsýni með dauðhreinsuðum spaða og sett í dauðhreinsuð plastílát eins og dritið. Þegar komið var upp á rannsóknarstofu var 50 mL af bufferuðu peptón vatni hellt yfir sandinn.

Í skólphreinsistöðinni við Klettagarða var notast við sérstaka grisjuvöndla til sýnatöku, en þeir hafa verið útbúnir á Örverufræðistofu Líffræðistofnunar og notaðir við rannsóknir í skólpkerfinu um árabil. Vöndlarnir voru látnir ofan í skólpíð eftir að það hafði farið í gegnum grófsíun og voru vöndlarnir hafðir ofan í skólpinu, í 5 daga sýni H1 og H2 og í 7 daga sýni H3, H4 og H5. Á rannsóknarstofu voru vöndlarnir færðir í dauðhreinsaðar krukkur og ca. 250 mL af bufferuðu peptón vatni hellt yfir.

1. sýnataka fór fram við Kópavogstjörn þann 12. apríl 2010. 2. sýnataka fór fram við Tjörnina í Reykjavík þann 19. apríl 2010. 3. sýnataka fór fram við Tjörnina í Reykjavík og ströndina við Skerjafjörð þann 26. apríl 2010 og fyrstu tveir vöndlar úr skólpí voru teknir upp 27. apríl 2010. 4. sýnataka fór fram í síkinu við Öskju þann 3. maí 2010 og þá voru einnig þrír vöndlar teknir úr skólpí. Samtals voru tekin 50 sýni, 20 vatnssýni, 15 dritsýni, 10 sandsýni og 5 skólpsýni.

2.3 Forræktun og auðgunarræktun („enrichment” ræktun)

2.3.1 Forræktunaræti

Notað var forræktunarætið bufferað peptón vatn (Oxoid CM509). Bufferað peptón vatn (BPW) er útbúið þannig að duftið er leyst upp í eimuðu vatni og síðan dauðhreinsað með því að “autoklavera” það við 121°C í 15 mínútur. Sýni er sett í BPW og það sett í hitaskáp við 37°C í 18-20 klst.

2.3.2 Sértaði auðgunaræti („enrichment” æti)

Notuð voru sértaðu auðgunarætin Rappaport-Vassiliadis Soya (RVS) Peptón Broth (Oxoid CM866) og Tetrathionate Broth Base (Difco 210430). RVS var leyst upp í eimuðu vatni og þegar efnið er uppleyst eru 10 mL af því settir í glös. Það er síðan

„autoklaverað” við 115°C í 15 mínútur. Eftir að RVS er tilbúið eru 0,1 mL færðir úr forræktinni í 10 mL af RVS og það sett inn í hitaskáp við 42°±1°C.

Tetrathionate Broth Base er leyst upp í eimuðu vatni og síðan hitað að suðu í örbylgjuofni. Síðan er það kælt niður fyrir 60°C í vatnsbaði og 2 mL af joð lausn bætt út í 100 mL af ætinu. 10 mL af Tetrathionate ætinu eru síðan færðir í dauðhreinsuð glös og út í það settur 1 mL af forræktinni. Þetta er sett inn í hitaskáp við 35°±2°C.

Ofangreind joðlausn er útbúin á eftirfarandi hátt: 6 g I₂ (Merck 4761) og 5 g KI (Merck 1.05043.0250) er sett í stórt mortel og þetta mulið saman. Síðan er 20 mL af eimuðu vatni bætt út í og efnið leyst upp.

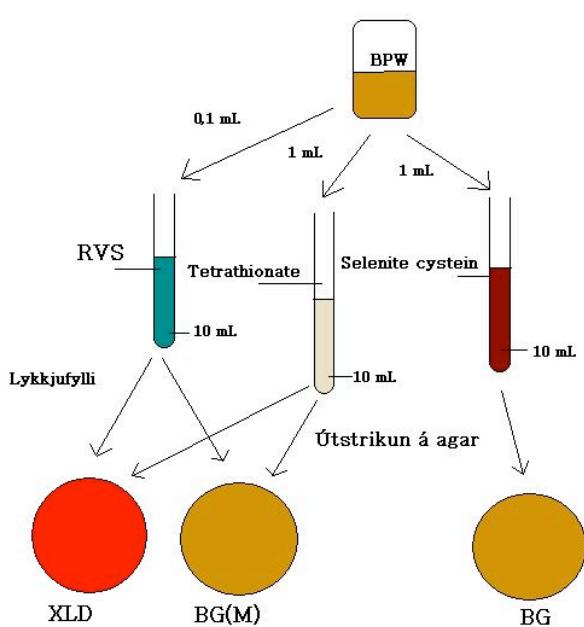
Til viðbótar við þessi tvö æti var Selenite Cystine Broth (Difco 268740) auðgunaræti notað fyrir skólpssýnin. Það er útbúið með því að leysa duftið upp í eimuðu vatni og lausnin hituð að suðu í örbylgjuofni. Ekki má ofhita ætið. Eftir kælingu eru 10 mL af ætinu settir í dauðhreinsuð glös og 1 mL úr forræktinni bætt út í.

2.4 Ræktun á sérhæfðum agarætum

Notuð voru sérhæfðu agarætin XLD (Oxoid CM469) og Brilliant green agar (modified) (Oxoid CM329). XLD agar er útbúinn þannig að 26,5 g af æti eru leyst upp í 500 mL af eimuðu vatni. Þetta er síðan hitað að suðu í örbylgjuofni og hrist reglulega á meðan. Ekki má ofhita XLD agarinn. Eftir að suðan er komin upp er agarinn færður strax í vatnsbað við 50°C. Þegar agarinn hefur kólnað er honum hellt í skálar. Brilliant green (modified) er útbúinn þannig að 26 g af æti eru leyst upp í 500 mL af eimuðu vatni og það hitað varlega í örbylgjuofni og hrist af og til á meðan. Suðan er rétt látin koma upp til að leysa ætið alveg upp og síðan er þetta kælt niður fyrir 50°C í vatnsbaði. Eftir að agarinn hefur kólnað er einu glasi af Sulphamandelate supplement (Oxoid SR87), sem leyst hefur verið upp í 5 mL af dauðhreinsuðu eimuðu vatni, bætt útí og blandað vel. Agarnum er síðan hellt í skálar.

Strikað var út með hefðbundinni strikun á agarskálarnar, lykkjufylli úr hverri RVS rækt á XLD og BG(M) og lykkjufylli úr hverri Tetrathionate rækt á XLD og BG(M) eftir 24 klst ræktun auðgunarætanna í hitaskáp og aftur eftir 48 klst ræktun í hitaskáp.

XLD agar skálarnar voru síðan settar inn í hitaskáp við 35-37°C í 18-24 tíma. BG(M) agar skálarnar voru settar í hitaskáp við 43°C í jafn langan tíma. Ráðlagt er að hafa BG(M) skálar í fullar 24 klst. í hitaskápnum (Fricke, 1987).



Mynd 3. Fyrstu stig á ræktun *Salmonella*.

Auk þessara tveggja sérhæfðu agaræta var Brilliant Green (BG) agar (Oxoid CM263) útbúinn. Þá eru 25 g af æti leyst upp í 500 mL af eimuðu vatni og upplausnin hituð að suðu í örbylgjuofni. Síðan er þetta dauðhreinsað með því að „autoklavera” það við 121°C í 15 mínútur. Eftir kólunum er agarnum hellt í skálar og hann láttinn storkna. Strikað var út á skálarnar með hefðbundinni strikun, en aðeins úr Selenite Cystein Broth ræktunum. Úr

þessum auðgunarræktum var líka strikað á XLD agar. Strikun fór fram tvisvar sinnum.

2.5 Einangrun og val *Salmonella* líkra kólónía

Skálarnar voru skoðaðar og *Salmonella* líkar kólóníur valdar úr. Ef ekki var talið að um afgerandi *Salmonella* kólóníur væri að ræða voru þær teknar með lykkju og þeim strikað aftur út á sams konar agar. Á XLD agar líta líklegar *Salmonella* kólóníur þannig út að þær eru rauðar og hafa stóra svarta miðju sem nær næstum út að brúnum kólóníanna sem eru rauðar. Á BG(M) eru líklegar *Salmonella* kólóníur rauðar og með rauðu svæði umhverfis. Á BG agar eru líklegar kólóníur ljósrauðar með rauðu svæði umhverfis.

Líklegum *Salmonella* kólóníum var síðan endurstrikað á Nutrient agar (Oxoid CM3) til þess að ganga úr skugga um að ræktirnar væru hreinar.

2.6 Lífefnafræðileg greiningarpróf

2.6.1 Forpróf

Gerðar voru lífefnafræðilegar forprófanir á líklegum *Salmonella* kólóníum með því að sá þeim í Urea agar, Triple Sugar Iron agar (TSI) og Lysine Iron agar (LIA).

Urea Agar Base (Oxoid CM53) er útbúinn þannig að 2,4 g af dufti er leyst upp í 95 mL af eimuðu vatni og lausnin hituð að suðu í örbylgjuofni. Þetta er síðan „autoklaverað” við 115°C í 20 mínútur og kælt niður fyrir 50°C. Þá eru 5 mL af dauðhreinsaðri 40% Urea lausn (Oxoid SR20) bætt út í og blandað vel. Síðan er agarinn pípetteraður í dauðhreinsuð glös og agarinn láttinn storkna í hallandi stöðu þannig að halli kemur á hann. Þegar agarinn er storknaður er tekin stroka úr líklegri kólóníu og henni sáð á hallann með lykkju. Glösin eru síðan látin inn í hitaskáp við 36°C og þau voru skoðuð eftir 10 klst. Triple Sugar Iron agar (Oxoid CM277) duft er leyst upp í eimuðu vatni og látið sjóða í örbylgjuofni til þess að leysa það alveg upp. Ætið er síðan „autoklaverað” við 121°C í 15 mínútur, látið kólna og pípetterað í dauðhreinsuð glös. Glösin eru látin í hallandi stöðu svo að halli myndast í agarinn. Þegar agarinn er storknaður er notaður beinn vír til sáningar. Þá er tekin stroka úr líklegri kólóníu á enda vírsins, vírnum er stungið í botninn og síðan er sáð í hallann. Þetta er látið í hitaskáp við 36°C og skoðað eftir 12 klst. Lysine Iron agar (Oxoid CM381) er leyst upp í eimuðu vatni og hitað að suðu í örbylgjuofni. Síðan er ætið „autoklaverað” við 121°C í 15 mínútur. Eftir að það hefur kólnað er því pípetterað í dauðhreinsuð glös sem eru látin í hallandi stöðu svo að halli myndast í agarinn. Sáning er eins og í TSI og eftir sáningu eru ræktirnar settar inn í hitaskáp við 36°C og skoðaðar eftir 12 klst.

2.6.2 API 20E fjölpróf

Byrjað er á því að undirbúa plastboxið sem API 20E ræman fer í, en þá eru 5 mL af dauðhreinsuðu eimuðu vatni settir í smáholurnar í neðri helming boxins til þess að hafa raka í boxinu. Síðan eru bakteríuræktirnar sem á að prófa leystar upp í 5 mL af dauðhreinsuðu eimuðu vatni. Valdar voru tvær ræktir úr hverju skólpsýni, ein úr Tetrathionate ætinu og ein úr RVS ætinu og að auki tvær ræktir úr Selenite ætinu. Bakteríulausninni er síðan dreift í hvert hólf á API ræmunni, fyllt er að opinu í öllum nema CIT, VP og GEL en þar er fyllt alveg upp í opið líka. Í ADH, LDC, ODC, URE og H₂S prófunum er fyllt upp í opið með ólífraðni (mineral) olíu til þess að skapa loftfirðar aðstæður. Ræman er síðan sett í plastboxið, því er lokað og sett inn í hitaskáp við 36°C. Mælt er með 18-24 klst. í hitaskáp en okkar API próf voru inni í 30 klst. Áður en aflestur fer fram þarf að framkvæma þrjú próf, VP próf, TDA próf og IND próf. Þá er einum dropa af viðeigandi „reagentum” bætt í þau hólf sem við á. Niðurstöður eru síðan skráðar á sérstakt niðurstöðublað.

3. Niðurstöður

3.1 Ræktun á sérhæfðum agarætum

Allar BG(M), XLD og BG skálar voru skoðaðar eftir 24 klst. ræktun í hitaskáp og líklegar *Salmonella* kólóníur einangraðar. Ef þær voru vel einangraðar var þeim strikað beint á næringaragar en annars var þeim fyrst endurstrikað á sams konar agar. Ekkert vatns- eða dritsýni úr Tjörninni í Reykjavík (TV1-TV10 og TD1-TD10) gaf líklegar *Salmonella* kólóníur, hvorki á BG(M) né XLD agar. Vatnssýni úr Vatnsmýri við Öskju voru einnig öll neikvæð. Eitt vatnssýni úr Kópavogstjörn gaf hugsanlega *Salmonella* kólóníu á BG(M) skál, KV5 T₂₄, en önnur voru neikvæð, bæði dritsýni og vatnssýni. Öll sandsýni af Skerjafjarðarströnd (SKS1-SKS10) voru neikvæð fyrir *Salmonella*. Sýni H1-H5, það er sýni sem tekin voru í skólpþreinsistöðinni að Klettagörðum gáfu öll af sér líklegar *Salmonella* kólóníur.

Tafla 1: Útstrikun rækta á næringaragar. Ræktunum var gefið nýtt sýnanúmer fyrir strikun á LIA, TSI og Urea agar.

Rækt	Nýtt nr	Rækt	Nýtt nr	Rækt	Nýtt nr
H1 R ₂₄ BG(M)-2-1	HL-1	H3 R ₂₄ XLD-2	HL-18	H5 T ₂₄ BG(M)-1-1	HL-35
H1 R ₂₄ BG(M)-1-1	HL-2	H3 R ₄₈ BG(M)-1	HL-19	H5 T ₄₈ BG(M)-1	HL-36
H1 R ₂₄ XLD-1	HL-3	H3 R ₄₈ XLD-1	HL-20	H1 Sel ₁₈ BG-3	HL-37
H1 R ₄₈ XLD-1	HL-4	H3 R ₄₈ XLD-2	HL-21	H1 Sel ₁₈ BG-1	HL-38
H1 R ₄₈ XLD-2	HL-5	H3 T ₂₄ BG(M)-1-1	HL-22	H1 Sel ₁₈ BG-2	HL-39
H1 T ₂₄ BG(M)-1	- *	H4 R ₂₄ BG(M)-1	HL-23	H1 Sel ₄₂ BG-1	HL-40
H1 T ₂₄ BG(M)-2	HL-6	H4 R ₂₄ XLD-1	HL-24	H1 Sel ₄₂ BG-2	HL-41
H2 R ₂₄ XLD-1	HL-7	H4 R ₂₄ XLD-1	HL-25	H2 Sel ₁₈ BG-1	HL-42
H2 R ₂₄ XLD-2	HL-8	H4 R ₄₈ XLD-1	HL-26	H2 Sel ₁₈ BG-2	HL-43
H2 R ₂₄ BG(M)-2-1	HL-9	H4 T ₂₄ BG(M)-1-1	HL-27	H2 Sel ₄₂ BG-1	HL-44
H2 R ₂₄ BG(M)-1-1	HL-10	H4 T ₄₈ BG(M)-1	- *	H2 Sel ₄₂ BG-2	HL-45
H2 R ₄₈ XLD-1	HL-11	H5 R ₂₄ BG(M)-1-1	HL-28	H3 Sel ₂₄ BG(M)-1	HL-46
H2 T ₂₄ BG(M)-1	HL-12	H5 R ₂₄ BG(M)-1-2	HL-29	H3 Sel ₂₄ BG(M)-2	HL-47
H2 T ₂₄ BG(M)-2	HL-13	H5 R ₂₄ BG(M)-2	HL-30	H4 Sel ₂₄ XLD-1	HL-48
H2 T ₄₈ BG(M)-1	HL-14	H5 R ₂₄ XLD-1-1	HL-31	H4 Sel ₁₂ BG(M)-1	HL-49
KV5 T ₂₄ BGM-1	HL-15	H5 R ₂₄ XLD-2-1	HL-32	H5 Sel ₂₄ BG(M)-1	HL-50
H3 R ₂₄ BG(M)-1	HL-16	H5 R ₄₈ XLD-1	HL-33	H5 Sel ₂₄ XLD-1	HL-51
H3 R ₂₄ XLD-1	HL-17	H5 R ₄₈ XLD-2	HL-34		

*Kólóníur voru grænleitar (líklega *Pseudomonas*) á næringaragar og því ekki taldar vera *Salmonella*. Þeim var því ekki strikað á TSI, LIA eða Urea agar.

3.2 Lifefnafræðileg greiningarpróf

Eftir skoðun á næringarágar var líklegum *Salmonella* stofnum sáð í Urea agar, LIA agar og TSI agar (sjá töflu 2 og töflu 3).

Tafla 2. Ureasa virkni í Urea agar eftir sáningu með líklegum *Salmonella* stofnum. Gulur litur merkir að sýni er Ureasa neikvætt en bleikur Ureasa jákvætt.

Urea agar			
Sýni	10 klst / 24 klst*	Sýni	10 klst
HL-1	Gulur	HL-27	Gulur
HL-2	Gulur	HL-28	Gulur
HL-3	Gulur	HL-29	Gulur
HL-4	Gulur	HL-30	Gulur
HL-5	Gulur	HL-31	Gulur
HL-6	Gulur	HL-32	Gulur
HL-7	Gulur	HL-33	Gulur
HL-8	Gulur	HL-34	Gulur
HL-9	Gulur	HL-35	Gulur
HL-10	Gulur	HL-36	Gulur
HL-11	Gulur	HL-37	Gulur
HL-12	Gulur	HL-38	Gulur
HL-13	Gulur	HL-39	Bleikur
HL-14	Appelsínugulur / bleikur	HL-40	Gulur
HL-15	Appelsínugulur / bleikur	HL-41	Gulur
HL-16	Gulur	HL-42	Gulur
HL-17	Gulur	HL-43	Gulur
HL-18	Gulur	HL-44	Gulur
HL-19	Gulur	HL-45	Gulur
HL-20	Gulur	HL-46	Gulur
HL-21	Gulur	HL-47	Gulur
HL-22	Gulur	HL-48	Gulur
HL-23	Gulur	HL-49	Gulur
HL-24	Gulur	HL-50	Gulur
HL-25	Gulur	HL-51	Gulur
HL-26	Gulur		

*Sýni 1-36 voru einnig skoðuð eftir 24 klst og þá voru sýni HL-14 og HL-15 orðin bleik en önnur voru eins.



Mynd 4. Ureasa neikvæður Urea agar (efri) og Ureasa jákvæður Urea agar (neðri).

Tafla 3. Litabreytingar í TSI og LIA agar eftir sáningu með líklegum *Salmonella* stofnum.

TSI					LIA				
Sýni	Halli	Botn	Gas	H ₂ S	Sýni	Halli	Botn	Gas	H ₂ S
HL-1	K	A	-	+	HL-1	K	K	-	+
HL-2	K	A	+	+	HL-2	K	K	-	+
HL-3	K	A	+	++	HL-3	K	K	-	+
HL-4	K	A	-	+	HL-4	K	K	+	+
HL-5	K	A	-	+	HL-5	K	K	-	+
HL-6	K	A	+	+	HL-6	K	K	-	+
HL-7	K	A	+	++	HL-7	K	K	-	+
HL-8	K	A	-	+	HL-8	K	K	-	+
HL-9	K	A	+	+	HL-9	K	K	+	+
HL-10	K	A	-	+	HL-10	K	K	+	+
HL-11	K	A	+	++	HL-11	K	K	(+)	+
HL-12	K	A	+	++	HL-12	K	K	-	+
HL-13	K	A	-	+	HL-13	K	K	(+)	+
HL-14	K	A	-	-	HL-14	K	A	++	-
HL-15	K	(A)	-	+	HL-15	-	-	-	-
HL-16	K	A	-	+	HL-16	K	K	(+)	+
HL-17	K	A	+	++	HL-17	K	K	-	+
HL-18	K	A	-	+	HL-18	K	K	-	+
HL-19	K	A	+	+	HL-19	K	K	+	+
HL-20	K	A	(+)	+	HL-20	K	K	+	+
HL-21	K	A	+	++	HL-21	K	K	(+)	+
HL-22	K	A	-	+	HL-22	K	K	+	+
HL-23	K	A	-	+	HL-23	K	K	-	+
HL-24	K	A	+	++	HL-24	K	K	+	+
HL-25	K	A	+	++	HL-25	K	K	-	+
HL-26	K	A	+	+	HL-26	K	K	(+)	+
HL-27	K	A	+	++	HL-27	K	K	+	+
HL-28	K	A	+	++	HL-28	K	K	+	+
HL-29	K	A	-	+	HL-29	K	K	(+)	+
HL-30	K	A	-	++	HL-30	K	K	+	+
HL-31	K	A	-	+	HL-31	K	K	-	+
HL-32	K	A	+	++	HL-32	K	K	-	+
HL-33	K	A	-	+	HL-33	K	K	-	+
HL-34	K	A	-	+	HL-34	K	K	(+)	+
HL-35	K	A	(+)	+++	HL-35	K	K	(+)	+
HL-36	K	A	+	++	HL-36	K	K	-	+
HL-37	K	A	-	+	HL-37	K	K	+	+
HL-38	K	A	+	+	HL-38	K	K	-	+
HL-39	K	(A)	+	+++	HL-39	K	K	-	+
HL-40	K	A	+	++	HL-40	K	K	-	+
HL-41	K	A	+	+	HL-41	K	K	-	+
HL-42	K	A	+	++	HL-42	K	K	+	+
HL-43	K	A	+	++	HL-43	K	K	+	+
HL-44	K	A	+	++	HL-44	K	K	+	+
HL-45	K	A	+	++	HL-45	K	K	+	+
HL-46	K	A	+	+	HL-46	K	K	-	+
HL-47	K	A	+	++	HL-47	K	K	+	+
HL-48	K	A	+	++	HL-48	K	K	-	+
HL-49	K	A	-	+	HL-49	K	K	-	+
HL-50	K	A	+	+	HL-50	K	K	+	+
HL-51	K	A	(+)	+	HL-51	K	K	+	+

Sýni HL-1 – HL-36 voru skoðuð eftir 12 klst. í hitaskáp en sýni HL-37 – HL-51 voru skoðuð eftir 10 klst. í hitaskáp.



Mynd 5. TSI agar með basískan halla (K), súran botn (A) og H₂S myndun.



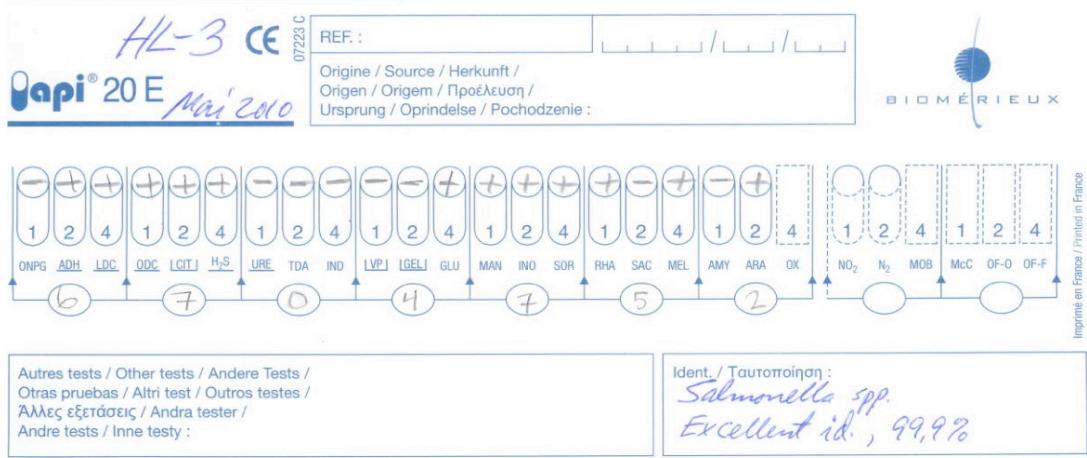
Mynd 6. LIA agar með basískan halla (K), basískan botn (K) og H₂S myndun.

Valdir voru 12 stofnar til þess að gera API 20E próf á. Þessir stofnar voru valdir með það til hliðsjónar að forpróf í Urea agar, TSI og LIA bentu til þess að um gæti verið að ræða *Salmonella* bakteríur. Sýni sem voru valin voru; HL-3, HL-6, HL-9, HL-12, HL-17, HL-22, HL-26, HL-27, HL-32, HL-35, HL-42 og HL-47. Mynd 7 sýnir API 20E ræmuna eftir að hvörf hafa átt sér stað.



Mynd 7. API 20E greiningarpróf. Breytingar á litum benda til annaðhvort jákvæðrar eða neikvæðrar niðurstöðu. Myndin á við stofn HL-6.

Aflestur af API ræmunum er síðan skráður á þar til gerð blöð eins og sjá má á mynd 8. Jákvæðar og neikvæðar niðurstöður gera það að verkum að út fást tölulegt gildi sem mynda að lokum sjö stafa talnarunu.



Mynd 8. Niðurstöðublað API 20E prófs fyrir sýni HL-3.

Út úr öllum sýnum kom talnarunana 6-704-752, nema hjá stofni HL-22 en þar kom út runan 6-704-552. Þessum talnarunum var síðan flett upp í þar til gerðri bók frá framleiðanda prófsins. Í ljós kom að báðar þessar runur stóðu fyrir *Salmonella* spp., sú fyrri hafði „excellent identification“ með 99,9% en sú síðari hafði „good identification“ með 97,6%.

Til þess að staðfesta þessar niðurstöður hefði þurft að gera Polyvalent O og Polyvalent H kekkjunarpróf fyrir *Salmonella* en ekki fékkst sermi til þess svo að því var sleppt.

4. Umræður

Nokkur munur virtist vera á auðgunarætunum RVS og Tetrathionate Broth Base og virðist sem RVS gefi af sér betri vöxt *Salmonella* bakteríu en engar tölulegar upplýsingar eru þó til um það í þessari rannsókn. Þó er ljóst að aðeins uxu líklegar *Salmonella* bakteríur úr Tetrathionate auðgunarætinu á BG(M) agar en engin óx á XLD agar eftir ræktun í Tetrathionate. *Salmonella* bakteríur úr RVS auðgunarætinu uxu jafnt á BG(M) sem og XLD agar. Þar sem TSI og LIA próf bentu til þess að um *Salmonella* væri að ræða jafnt úr stofnum sem ræktaðir voru í Tetrathionate og RVS er ljóst að þau virka bæði eins og þau eiga að gera. Svo virðist þó sem ræktun í RVS gefi betri heimtur *Salmonella* bakteríu.

Eini stofninn sem ekki var úr skólpi (HL-15; KV5 T₂₄) reyndist ekki vera *Salmonella* en þessi stofn var ureasa jákvæður. *Salmonella* hefur ekki ureasa þannig að ljóst er að um aðra bakteríu var að ræða. Stofnarnir HL-14 og HL-39 voru einnig ureasa jákvæðir og þar af leiðandi ekki *Salmonella*. Niðurstöður ureasa, TSI og LIA prófs bentu til þess að öll hin sýnin sem prófuð voru gætu verið *Salmonella*. API 20E fjölprófin staðfestu þær niðurstöður hjá þeim tólf stofnum sem prófaðir voru með því.

Af 50 umhverfissýnum voru aðeins 5 jákvæð fyrir *Salmonella* og þau voru eins og fyrr segir öll úr skólpi úr skólpheinsistöðinni. Það var viðbúið að þau sýni yrðu jákvæð fyrir *Salmonella* þar sem skólp er mjög mengað og skólp frá stórum hluta höfuðborgarsvæðisins rennur í gegnum skólpheinsistöðina við Klettagarða. Það kom nokkuð á óvart að engin önnur umhverfissýni skyldu vera jákvæð fyrir *Salmonella* þar sem það er vitað að hún getur lifað af við erfiðar umhverfisaðstæður utan hýsils eins og rætt var um í inngangi. Dritsýni voru flest úr öndum og gæsum sem voru við tjarnirnar en það virðist ekki vera *Salmonella* sýking til staðar í þessum fuglum. Rannsóknir í Bretlandi hafa til að mynda sýnt fram á *Salmonella* mengað drit úr bæði öndum og gæsum. (Feare, 1999, Mitchell og Ridgwell, 1971). *Salmonella* virðist þó ekki vera algengur sýkill í þessum fuglategundum miðað við aðra fugla. Það sést til dæmis í tölu um *Salmonella* sýkingar í fuglum í Noregi frá árunum 1969-2000. Þar var *Salmonella* einangruð úr 470 fuglum og af þeim var eitt tilfelli úr gæs en ekkert úr önd (Refsum o.fl., 2002).

Vatnið úr tjörnunum tveimur og síkinu við Öskju gaf ekki neinar *Salmonella* bakteríur við ræktun en þó var nægur vöxtur annarra bakteríu. Einnig þótti mér sem vatnssýni sem tekin voru úr Tjörninni í Reykjavík og úr síkinu við Öskju væru nokkuð mikið

menguð miðað við hið tæra vatn sem tekið var úr Kópavogstjörn. Það má því vel vera að *Salmonella* bakteríur hafi verið til staðar en í það litlu magni að aðrar bakteríur hafi vaxið yfir þær eða að þéttileiki þeirra í vatninu hafi verið svo lítill að þær náðust ekki í vatnssýnum. Sandurinn við Skerjafjörð var mjög hreinn samkvæmt þessari rannsókn en mjög lítill vöxtur á agarskálunum var af bakteríum úr sandsýnum. Hér áður fyrr þurfti oft að veita skólpi út í sjó þarna um yfirlallið en eftir að nýja skólpþreinsistöðin við Klettagarða var tekin í gagnið er það mjög sjaldgæft. Aðrar dælustöðvar, svo sem við Ánanaust, skipta þarna líka miklu máli.

Mögulega hefði þurft að taka fleiri sýni til þess að finna *Salmonella* í umhverfissýnum, en þó er einnig möguleiki á því að *Salmonella* hafi hreinlega ekki verið til staðar á þessum stöðum á þessum tíma. Það eru í sjálfu sér góðar fréttir enda getur *Salmonella* verið hættulegur umhverfissýkill og sýnatökustaðirnir eru vinsælir viðkomustaðir fólks með ung börn. Árstíminn getur haft áhrif en sýni voru eins og fyrr segir tekin á tímabilinu 12. apríl til 3. maí. Meira líf og þar af leiðandi meiri mengun er oftast á sumrin í Reykjavík og nágrenni og því gæti verið áhugavert að framkvæma hliðstæða rannsókn að sumarlagi. Það er til dæmis vel þekkt á Íslandi að *Salmonella* tilfellum í mönnum fjölgar verulega á sumrin (Landlæknisembættið, 2009). Það ber einnig að hafa í huga að öll sýni nema sýnin úr skólpinu voru punktsýni í tíma. Þar var sýnum safnað frá einum stað á einum tíma á meðan sýnataka úr skólpinu var sýnataka yfir tímabil þar sem vöndlarnir voru ofan í rennandi skólpi í nokkra daga. Þetta getur haft áhrif þar sem bakteríur eru eins og fyrr segir sjaldan jafndreifðar í umhverfinu og þegar sýni eru punktsýni í tíma þarf þess vegna að passa að sýnafjöldi sé nægilega mikill.

Ekki þarf að hafa áhyggjur af því að aðferðafræðin hafi verið ófullkomin þar sem *Salmonella* bakteríur einangruðust með aðferðinni sem lagt var upp með og lýst er í kafla 2.

Niðurstöður þessarar rannsóknar staðfesta einungis að *Salmonella* hafi einangrast en ekki var farið út í greiningu á serótýpum. Það gæti verið áhugavert að skoða það og sjá hvort um sömu serótýpuna hafi verið að ræða í öllum sýnum eða hvort einhver fjölbreytileiki hafi verið til staðar.

5. Heimildaskrá

- Angulo, F.J., Tippen, S., Sharp, D.J., Payne, B.J., Collier, C., Hill, J.E., Barrett, T.J., Clark, R.M., Geldreich, E.E., Donnell, H.D. og Swerdlow, D.L. (1997). A community waterborne outbreak of salmonellosis and the effectiveness of a boil water order. *American Journal of Public Health.* **87**:580-584.
- Bakteríufræði. (2007). Hefti tekið saman af Guðna Á. Alfreðssyni. Háskólaprent, Reykjavík.
- Barrett, T.J., Blake, P.A., Morris, G.K., Puhr, N.D., Bradford, H.B. og Wells, J.G. (1980). Use of Moore swabs for isolating *Vibrio cholerae* from sewage. *Journal of Clinical Microbiology.* **11**: 385-388.
- Bridson, E.Y. (Ritsjóri) (1995). *The Oxoid manual.* 7.útgáfa (bls 2-139 og 2-211), Unipath Limited, Basingstoke, England.
- Cherry, W.B., Hanks, J.B., Thomason, B.M., Murlin, A.M., Biddle, J.W., og Croom, J.M. (1972). Salmonellae as an index of pollution of surface waters. *Applied Microbiology.* **24**: 334-340.
- Cooper, R.C. og Danielson, R.E. (1997). Detection of bacterial pathogens in wastewater and sludge. Í Hurst,C.J., Knudsen, G.R., McInerney, M.J., Stetzenbach, L.D., og Walter, M.V. (ritstjórar), *Manual of Environmental Microbiology.* 3.útgáfa, kafli 23 (bls 222-230) ASM Press, Washington, D.C.
- Crum-Cianflone, N.F. (2008). Salmonellosis and the GI tract: More than just peanut butter. *Current Gastroenterology Reports.* **10**: 424-431.
- Desmonts, C., Minet, J., Colwell, R. og Cormier, M. (1990). Fluorescent-Antibody method useful for detecting viable but nonculturable *Salmonella* spp. in chlorinated wastewater. *Applied and Environmental Microbiology.* **56**: 1448-1452.
- Eggert Gunnarsson, Gunnar Órn Guðmundsson og Sigríður Björnsdóttir (2009). „Dýrasjúkdómar – Salmonella í hrossum”. Sótt af slóðinni: <http://www.mast.is/upplysingar/hestamenn/salmonellaihrossum> þann 8.maí 2010.
- Feare, C.J., Sanders, M.F., Blasco, R. og Bishop, J.D. (1999). Canada goose (*Branta canadensis*) droppings as a potential source of pathogenic bacteria. *The Journal of The Royal Society for the Promotion of Health.* **119**: 146-155.
- Fricke, C.R. (1987). The isolation of salmonellas and campylobacters. *Journal of Applied Bacteriology.* **63**: 99-116.
- Heilbrigðiseftirlit Hafnafjarðar- og Kópavogssvæðis. „Kópavogur (eldri mælingar)”. Tekið af slóðinni:http://www.heilbrigðiseftirlit.is/Innihald_heimasida/Umhverfi/laekir_og_votn/Kopavogslaekur.htm þann 12 maí 2010.

Hilmar J. Malmquist, Finnur Ingimarsson, Haraldur Rafn Ingvason og Stefán Már Stefánsson. (2008). Mengunarflokkun á Reykjarvíkurtjörn. Unnið fyrir Umhverfis- og samgöngusvið Reykjarvíkurborgar.

Kuhn, J.C. (2007). Detection of *Salmonella* by Bacteriophage Felix O-1. *Methods in Molecular Biology*. **394**: 21-37.

Landlæknisembættið (2009). „Salmonellusýkingar – tölur” Salmonellusýkingar eftir mánuðum og ári 1997-2008.xls. Sótt af slóðinni: <http://www.landlaeknir.is/Pages/891> þann 16.maí 2010.

Matvælastofnun (2009). „Hvers vegna er innflutningur skriðýra til Íslands bannaður?”. Tekið af slóðinni: <http://visindavefur.is/?id=53115> þann 5.maí 2010.

Mitchell, T.R. og Ridgwell, T. (1971). The frequency of salmonellae in wild ducks. *Journal of Medical Microbiology*. **4**: 359-361.

NN (2001). *Global Salm-Surv. A global Salmonella surveillance and laboratory support project*. The World health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response (CSR), in collaboration with Centers for Disease Control and Prevention, USA and Danish Veterinary Laboratory, Denmark.

NN (2002). *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Salmonella spp.* British standards, EN ISO 6579:2002. Sótt af slóðinni: <http://www.prise-pcp.org/FichiersComplementaires/cd/2006/documents/general-information/01-iso-06579-fdis.pdf> þann 17.maí 2010.

NN (2004). *api® 20E, Identification system for Enterobacteriaceae and other non-fastidious Gram-negative rods*. Bæklingur gefinn út af bioMérieux, Inc. Prentað í Frakklandi.

Oliveira,S.D., Rodenbusch, C.R., Cé, M.C., Rocha, S.L.S og Canal, C.W. (2003). Evaluation of selective and non-selective enrichment PCR procedures for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*. **36**: 217-221.

Polo, F., Figueras, M.J., Inza, I., Sala, J., Fleisher, J.M. og Guarro, J. (1999). Prevalence of *Salmonella* serotypes in environmental waters and their relationships with indicator organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. **75**: 285-292.

Refsum, T., Handeland, K., Baggesen, D.L., Holstad, G. og Kapperud, G. (2002) *Salmonellae in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000*. *Applied and Environmental Microbiology*. **68**: 5595-5599.

Safarík, I., Safaríková, M. og Forsythe, S.J. (1995). The application of magnetic separations in applied microbiology. *Journal of Applied Bacteriology*. **78**: 575-585.

Sears, S.D., Ferreccio, C., Levine, M.M., Cordano, A.M., Monreal, J., Black, R.E., D’Ottone, K., Rowe, B. and the Chilean Typhoid Committee (1984). The use of Moore swabs for isolation of *Salmonella typhi* from irrigation water in Santiago, Chile. *The Journal of Infectious Diseases*. **149**: 640-642.

Sigurður Steinþórsson (2004). „Hvernig mynduðust Kvosin og Tjörnin í miðbæ Reykjavíkur?“. Vísindavefurinn. Sótt af slóðinni: <http://visindavefur.is/?id=3965> þann 29.apríl 2010.

Thomason, B.M., Dodd, D.J. og Cherry, W.B. (1977). Increased recovery of *Salmonellae* from environmental samples enriched with buffered peptone water. *Applied and Environmental Microbiology*. **34**: 270-273.

Tizard, I. (2004). Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. **13**: 50-66.

Ulitzur, N. og Ulitzur, S. (2006). New rapid and simple methods for detection of bacteria and determination of their antibiotic susceptibility by using phage mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. **72**: 7455-7459.

„Umfangsmesta áfanga nýs fráveitukerfis lokið“ (2002, 4.maí). Morgunblaðið á netinu. Sótt af slóðinni: http://www.mbl.is/mm/gagnasafn/grein.html?grein_id=665621 þann 28.apríl 2010.

Voetsch, A.C., Van Gilder, T.J., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C. og Tauxe, R.V. (2004). FoodNet estimate of the burden of illness caused by nontyphoidal *Salmonella* infections in the United States. *Clinical Infectious Diseases*. **38**: S127-134.

Welkos, S., Schreiber, M., og Baer, H. (1974). Identification of *Salmonella* with the O-1 Bacteriophage. *Applied Microbiology*. **28**: 618-622.

Winfield, M.D. og Groisman, E.A. (2003). Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. **69**: 3687-3694.

Viðauki 1: Kort af sýnatökustöðum



Mynd 9. Kópavogstjörn. Efst sést götukort, fyrir neðan er loftmynd og innfelld mynd er tekin á staðnum. Númer vísa til sýnatökustaða.



Mynd 10. Tjörnin í Reykjavík. Efst sést götukort, fyrir neðan er loftmynd og innfelld mynd er tekin á staðnum. Númer vísa til sýnatökustaða. Við Tjörnina í Reykjavík voru tekin 10 sýni. Sýni 6-10 voru tekin á sömu stöðum og sýni 1-5, það er sýni 6 á sama stað og sýni 1 o.s.frv.



Mynd 11. Síki við Öskju, náttúrufræðihús. Efst sést götukort, fyrir neðan er loftmynd og innfelld mynd er tekin á staðnum. Númer vísa til sýnatökustaða.



Mynd 12. Ströndin við Skerjafjörð. Efst sést götukort, fyrir neðan er loftmynd og innfelld mynd er tekin á staðnum. Númer vísa til sýnatökustaða.



Mynd 13. Skólpheinsistöðin við Klettagarða. Efri mynd sýnir götukort og fyrir neðan er loftmynd af staðsetningu byggingarinnar.



Mynd 14. Inni í skólphreinsistöðinni. Grisjuvöndlarnir voru látnir ofan í þró sem er undir hlera á gólfínú þar sem skólpið rann í gegn eftir grófsíun.