



**Háskólinn
á Akureyri**
University
of Akureyri

Agarasi úr sjávarbakteríum

Einkenni baktería frá hverastrýtum sem framleiða
agarasa

Kolfinna Ólafsdóttir

Auðlindadeild
Viðskipta- og raunvísindasvið
Háskólinn á Akureyri
2021

Agarasi úr sjávarbakteríum

Einkenni baktería frá hverastrýtum sem framleiða
agarasa

Kolfinna Ólafsdóttir

12 eininga lokaverkefni í líftækni
sem er hluti af
Baccalaureus Scientiarum-prófi í raunvísindum

Leiðsögukennari
Arnheiður Eyþórsdóttir

Auðlindadeild
Viðskipta- og raunvísindasvið
Háskólinn á Akureyri
Akureyri, Apríl 2021

Titill: Agarasi úr sjávarbakteríum

Stuttur titill: Einkenni baktería frá hverastrýtum sem framleiða agarasa
12 eininga bakkalárprófsverkefni sem er hluti af Baccalaureus Scientiarum-prófi í
raunvísindum.

Höfundarréttur © 2021 Kolfinna Ólafsdóttir
Öll réttindi áskilin

Auðlindadeild
Viðskipta- og raunvísindasvið
Háskólinn á Akureyri
Sólborg, Norðurlóð 2
600 Akureyri

Sími: 460 8000

Skráningarupplýsingar:

Kolfinna Ólafsdóttir, 2021, bakkalárprófsverkefni, Auðlindadeild, viðskipta- og
raunvísindasvið, Háskólinn á Akureyri, 45 bls.

Prentun: Ásprent
Akureyri, 9. apríl, 2021

Ágrip

Verkefni og ritgerð eru lögð fram til B.S. prófs í líftækni við Viðskipta- og raunvísindasvið Háskólans á Akureyri. Markmið verkefnisins var fyrst og fremst að skima eftir ákveðinni ensímvirkni hjá bakteríum sem fengnar voru úr svömpum sem höfðu verið í grennd við Arnarnesstrýtur í Eyjafirði.

Í verkefninu voru 5 stofnar af 32 sem ræktuðust upp og voru notuð lífefna- og sameindalíffræðileg próf til að lýsa einkennum þeirra. Ákveðnir stofnar grófu sig niður í æti og sýndu þannig vísbendingu um agar niðurbjótandi ensímvirkni sem er af völdum ensímsins agarasa. Stofnarnir voru tegundagreindir með 16S rDNA raðgreiningu og agarasa ensímvirkni þeirra skoðuð með bæði sjáanlegum ummerkjum á agar-ætum og Lugol's litar aðferð.

Alls voru 4 af þessum 5 stofnum sem grófu sig niður í agar-æti og sýndu útlit kólónía þeirra og niðurstöður úr lífefnafræðilegum prófum að þeir tilheyrðu sömu ættkvíslinni. Þetta var síðar staðfest með 16S rDNA greiningu sem benti til að þeir tilheyrðu ættkvíslinni *Cellulophaga*. Eftirstandandi stofninn var, samkvæmt 16S rDNA raðgreiningu, innan *Vibrio* ættkvíslarinnar sem sýndi ekki fram á neina agar niðurbjótandi ensímvirkni og var því ekki frekar kannaður hvað varðaði ensímvirkni. Til staðfestingar um tilvist agarasa niðurbrots var notuð Lugol's lausn sem gefur augljósar niðurstöður hvort agarinn hefur verið niðurbrotin eða ekki.

Tími og samfélagsaðstæður leyfðu ekki vinnu við einangrun og hreinsun ensímsins til að kanna frekar agarasa virkni hjá stofnunum en væri það áhugavert verkefni til að vinna með í frekari rannsóknum í framtíðinni. Agarasi er verðmætt ensím þar sem það veldur vatnsrofi og þannig niðurbrot agars. Agarobíósi og neoagarobíósi eru myndefni sem fást úr agar niðurbroti með agarasa. Rannsóknir hafa sýnt fram á að agarobíósi og neoagarobíósi geta t.d. haft áhrif á bæði lífeðlis- og líffræðilega starfsemi hjá mönnum.

Lykilorð: Agarasi, Sjávarbakteríur, Arnarnesstrýtur, Agar, 16S rDNA, *Cellulophaga*, *Vibrio*

Abstract

In this research were used 32 bacteria stains which had been isolated in another project from sponges near the shallow hydrothermal vents in Eyjafjörður, north of Iceland. Of the 32 stains, only 5 grew on the media and were used in further research.

The strains were characterized with 16S rDNA sequencing, along with testing for agarase enzyme which catalyses the hydrolysis of agar (agar-agar). Agarase existence in the strains was examined both with noticeable marks on marine agar and Lugol's colour method.

Only 4 of 5 the strains produce agarase and they all seemed to belong within the same genus, *Cellulophaga*. The other strain was from the *Vibrio* genus, which made sense that they were not from the same genus due to the completely different characteristics considering the other bacteria. The agarase activity was visible on marine agar due to obvious degradation of the agar surrounding the colonies. To verify the agar degradation, Lugol's solution was used and created halos around the bacteria which had degraded agar around them.

Both a short amount of time and nonpermissive conditions in the community did not allowed further research for the enzyme. In the future this could lead to an interesting project because of the agarase enzyme value. Various researches have shown high economic values of the enzyme because of their physiological and biological activities.

Formáli

Með þessari ritgerð lýk ég vinnu minni við B.S. gráðu úr líftækni við viðskipta- og raunvísindasvið Háskólans á Akureyri. Hugmyndin af verkefninu kom í byrjun loka árs míns en þá hafði vínkona mín, Sævör Dagný Erlendsdóttir kom með þá hugmynd að vinna lokaverkefni í tengslum við örverur í neðansjávar strýttunum í Eyjafirði og það þurfti ekki meira til að vekja áhuga minn. Ensímið agarasi kom ekki upp í samræðurnar fyrr en þegar leiðbeinandinn minn, Arnheiður Eypórsdóttir minntist á hugsanlega agarasa ensímvirkni hjá bakteríustofnum úr hennar meistaraverkefni. Það varð til þess að agarasi úr þessum bakteríum varð aðal umfangsefni verkefnisins míns.

Leiðbeinandi verkefnisins, Arnheiður Eypórsdóttir verðskuldar allra bestu þakkir fyrir alla þolinmæði, hjálp og leiðsögn sem hún veitti við gerð verkefnisins. Ekki síst vil ég þakka öllum þeim sem koma að ritgerðarinni þ.e. gagnasöfnun, yfirlestri og öðru sem hjálpaði til við vinnu verkefnisins, fyrir ómetanlegt framlag þeirra.

Svo vil ég þakka vinum mínum sem hafa gegnið í gegnum þessa skólagöngu með mér. Þið munuð alltaf eiga sérstakan stað í hjartanu mínu en án ykkar hefði þetta aldrei verið svona gaman. Ég á svo sannarlega eftir að sakna tímans sem við eyddum saman í háskólanum. Ég er ákvaflega þakklát fyrir mitt nánasta fólk sem hefur verið stoð mín og stytta í gegnum námsferilinn minn en án ykkar þá væri ég ekki í sömu sporum sem ég er í dag. Takk fyrir allt!

Efnisyfirlit

1	INNGANGUR	1
1.1	HÁHITASJÁVAR SVÆÐI	1
1.2	GRUNNVATNS STRÝTU VIRKNI	1
1.3	SVAMPAR	3
1.4	AGAR	4
1.5	ENSÍM	5
	<i>SJÁVARTENGD ENSÍM</i>	5
	<i>AGARASI</i>	6
2	AÐFERÐIR OG EFNI	9
2.1	STOFNAR OG ÆTI	9
2.2	GREININGARPRÓF	9
2.3	16S RDNA GREINING	10
2.4	ENSÍMVIRKNI	11
3	NIÐURSTÖÐUR	13
3.1	GREININGARPRÓF	13
3.2	ENSÍMVIRKNI	14
3.3	16S RDNA GREINING OG STOFNAR	17
	<i>L104-1</i>	17
	<i>L104-2</i>	18
	<i>L104-3</i>	18
	<i>L-104-4</i>	19
	<i>L206-53</i>	20
4	UMRÆÐUR	21
4.1	ENSÍMVIRKNI	21
	<i>AGARASI ENSÍMVIRKNI</i>	21
4.2	STOFNAR	21
	<i>ALMENNT UM CELLULOPHAGA</i>	22
	<i>ALMENNT UM VIBRIO</i>	23
4.3	NÆSTU SKREF	25
	HEIMILDIR	27
	VIÐAUKI	35

Myndayfirlit

Mynd 1 : Staðsetningar strýta í Eyjafirði á norðanverðu Íslandi (Harrison, 2010).	2
Mynd 2 : Bygging agarósa (Fu og Kim, 2010).	4
Mynd 3 : Bygging agaróbíosi (A) og neoagaróbíosi (B) (Fu og Kim, 2010).	6
Mynd 4 : Niðurstöður úr Lugol's lituninni	16
Mynd 5 : Niðurstöður úr Lugol's lituninni fyrir stofn L206-53	16
Mynd 6 : Stofn L104-1 í marine broth	17
Mynd 7 : Stofn L104-1 á marine agar	17
Mynd 8 : Stofn L104-2 á marine agar	18
Mynd 9 : Stofn L104-3 á marine agar	18
Mynd 10 : Stofn L104-4 á marine agar	19
Mynd 11 : Sjáanlegt niðurbrot agars á marine æti	19
Mynd 12 : Stofn L206-53 á marine agar	20
Mynd 13 : Stofn L206-53 í marine broth	20
Mynd 14 : Litabreytingar hjá <i>C. lytica</i> (Kientz, Marié og Rosenfeld, 2012).	22

Töfluyfirlit

Tafla 1 : Kóloníu PCR ferlið.....	10
Tafla 2 : Niðurstöður úr litlum tilraungum (gramlitun, KOH "string" o.fl.).....	14
Tafla 3 : Staðalar í nanomólum.....	15
Tafla 4 : Niðurstöður úr API ZYM.....	15
Tafla 5 : Upprunalegu stofnarnir.....	35

1 Inngangur

Um 71% jarðarinnar er þakin vatni og er það heimkynni fjölbreytilegs lífríkis sem enn í dag er tiltölulega lítið kannað. Vistkerfi sjávar er talið búa yfir gríðarlegri fjölbreytni lífríkis og örverum sem hafa mun meiri áhrif á allt lífríki á jörðinni heldur en hefur verið talið áður. Bakteríur, sveppir og þörungar sem sveima um höfin virðast vera rík auðlind sérstakra ensíma sem gæti breytt líftækninni sem við þekkjum í dag (Jahromi og Barzkar, 2018).

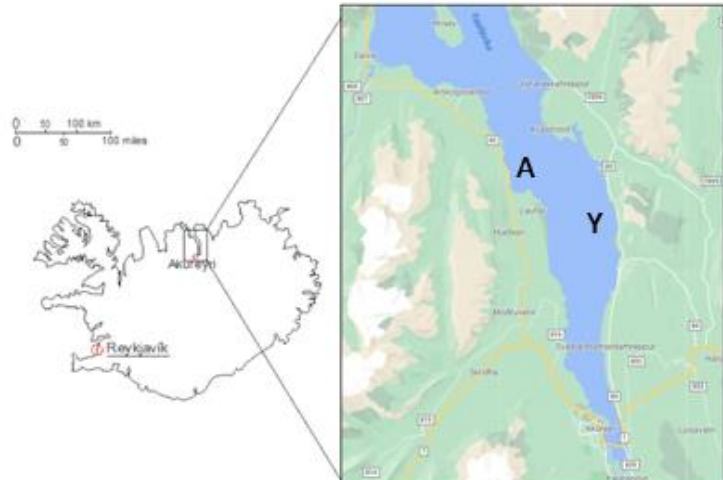
1.1 Háhitasjávar svæði

Árið 1977 voru fyrstu uppgötvanir háhitastrýta eða strompa á botni sjávar. Strýtur eru stórir hverir eða strompar sem spýta út heitum vökva líkt og gjósandi hver. Ferskvatnið sem gýs út úr þeim er heitt og efnaríkt vatn sem útbýr einstakt umhverfi fyrir lífríki í kringum strompanna. Rannsóknir sýna fram á að langlífir strompar virðast myndast gjarnan nálægt háhitasvæði líkt og á úthafshryggjum þar sem mikil eldvirkni er. Út frá þessu má áætla að virkni strýtanna stjórnist af stærð hita uppsprettu og þéttni rása þeirra (Joseph, 2017). Einstök lífríki hafa myndast bæði í og umhverfis neðansjávarstrýturnar sem gerir þessi svæði sérstök. Oft má finna efnatillífangi örverur í tengslum við strýturnar sem hafa aðlagast að öfgafullu aðstæðunum umhverfis strompanna þ.e. heita efnamettaða vatninu sem gýs upp úr þeim með miklum þrýsting. Einnig má finna stærri lífverur í kringum strýturnar líkt og krabbar, kræklingar, rækjur og samskonar skelfiskur sem getur lifað í þessum sérstöku aðstæðum (Schreier og Lutz, 2019).

1.2 Grunnvatns strýtu virkni

Grunnvatns strýtur má finna á <200 m dýpi sjávar sem má, líkt og djúpsjávar strýturnar, einkenna þær út frá heita vökvanum sem gýs upp úr þeim sem getur verið á bilinu 10-199°C. Vökvinn sem rís úr þeim getur oft verið mjög efnaríkur og jafnvel málmrík uppspretta sem má gjarnan tengja við jarðefnafræðilegar hringrásir (geochemical cycles). Málmar sem eiga til að gjósa upp úr gígunum með efnaríka vatninu samanstanda af t.d. járni, brennisteini og kolefnum (Bellec o.fl., 2020).

Í miðjum Eyjafirði sem staðsettur er norður af Íslandi, finnast nokkrar strýtur eða leir-stæður sem rísa 25-45 m frá sjávarbotni. Þessum strompum er gjarnan skipt upp í tvö aðskilin svæði en talið að þeir hafi sömu hitauppsprettuna sem tengir svæðin tvö innbyrðis (Umhverfisstofnun, 2003). Svæðin skiptast eftir staðsetningu eins og sést á mynd 1 sem þá kallast annarsvegar Ystuvíkurstýtur sem eru merktar (Y) sem eru staðsettar í austurhluta fjarðarins og annarvegar Arnarnesstrýtur (A) sem liggja vestan megin í firðinum.



Mynd 1 : Staðsetningar strýta í Eyjafirði á norðanverðu Íslandi (Harrison, 2010).

Strýtur innan þessa beggja svæða eru einstakar á heimsælikvarða vegna þess að þær eru þær einu í heiminum sem hafa fundist á slíku grunni svæði og einnig töluvert frá virkum gosbeltum eða úthafshryggjum til að halda strýtum virkum (Viggó Thór Marteinsson o.fl., 2001).

Úr strýtum streyma um það bil 50 lítrar á sekúndu af heitum vökva sem blandast við kaldan sjóinn. Við þessa blöndun vökva myndast sérstök efnasambönd sem byggja upp strýturnar stöðugt en hægt með tímanum. Efnasamsetning strýtanna virðist vera magnesíumsilíkat sem myndast vegna samblöndunar kísilríka jarðhitavatnsins og kalda magnesíumríka sjónum. Þessi efnasamsetning gerir strýturnar enn meira frábrugðnari frá hefðbundnu og þekktu djúpsjavar strýtum, þar sem þær eru gjarnan gerðar úr kísilsúlfiði og anhýdríð-útfellingum. Þessar ólíku efnasamsetningar er hugsanlega vegna saltari jarðhitavats og efna-mettaðri djúpsjavar (Geptner, Kristmannsdóttir, Kristjánsson og Marteinsson, 2002).

Vegna þessara einstöku aðstæðna, gæti verið áhugavert að skoða þetta umhverfi þar sem það gæti hugsanlega verið staður fyrir sérstakt lífríki til þess að þroskast og dafna. Aðstæður í kringum strýturnar í Eyjafirði eru góðar hvað varðar aðgengi fyrir sýnatökur til þess að safna saman og skoða mismundandi örverur sem geta lifað í frábrugðnum umhverfum þ.e. frá því sem þekkt er annarsstaðar. Rannsóknir sem hafa verið gerðar á grunnvatns strýtum sýna að þær mynda fullkomið umhverfi fyrir bæði ljóstillífunar- og efnafræðilegar frumvinnslu efna, sem skilgreinir þær frá þeim strýtum sem finnast í djúpum sjávar (Bellec o.fl., 2020). Þetta þýðir

að þrátt fyrir auðveldara aðgengi að grunnvatns strýttunum, þá er örveruflóra þeirra hugsanlega frábrugðin þeirri sem finnst kringum djúpsjár strompanna. Ástæða þess er hreinlega aðrar umhverfis aðstæður eins og hiti vatnsins úr strompunum og efnasambönd í og kringum þær. Ef allt er takið með í reikningin þá kemur það að sjálfu sér ekki á óvart að finna megi ólík lífríki í kringum strýttunarnar (Tarasov, Gebruk, Mironov og Moskalev, 2005).

1.3 Svampar

Meira en helmingur sjávardýra eru taldir vera hryggleysingar og í hópi þeirra eru meðal annars svampar. Þeir eru gott dæmi um dýr sem finnast gjarnan í kringum neðansjár hverji líkt og Arnarnes- eða Ystuvíkurstkýttunarnar. Þeir eru einstök dýr sem tilheyrir Polífera fylkingu dýra en þeir eru fjölfrumungar sem hafa takmarkað af vefjum og líffærum (Feuda o.fl., 2017). Til eru um það bil 10.000 þekktar tegundir svampa sem tilheyra yfir 128 fjölskyldum og aðlaga sig vel að umhverfi sem gerir þeim auðvelt að fjölga sér og dafna í ótrúlegustu aðstæðum. Flestar þessa tegunda lifa í söltum sjó og þá sérstaklega þar sem grunnt er til botns en einnig er vitað um tegundir sem ná niður undir 8.800m dýpi (Vacelet og Duport, 2004).

Svampar hafa mikið af holum á líkama sínum sem leyfir vatni að streyma í gegnum þá og í stað tauga-, meltingar- og hjarta- og æðakerfis, nota svampar gegnum vatnsstreymi þeirra til að fá súrefni og mat, sem að auki losar þá við næringarsnauð úrgangsefni (Thacker o.fl., 2014). Svampar eru einnig svokölluð botnsætin eða kyrrsetin sjávardýr sem þýðir að þeir festa sig við fast undirlag og færa sig aldrei frá þeim stað. Því kemur ekki á óvart að lögun svampa sé einstök þar sem þeir verða að aðlaga sig að umhverfi sínu og eru byggðir eftir vatnsstreyminu í kringum þá, þ.e. til að nýta það sem best (Vacelet og Duport, 2004).

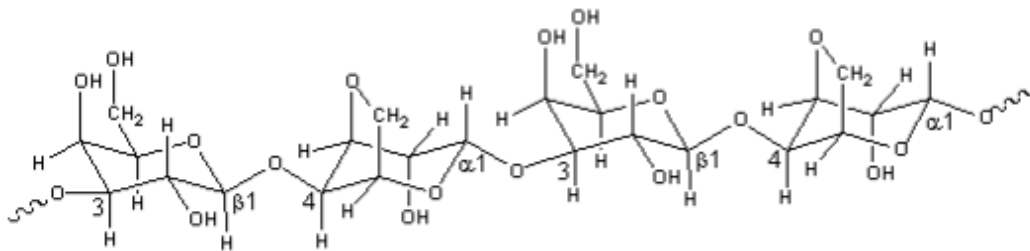
Þegar vatn eða sjór rennur í gegnum svampdýr, fer það fyrst í gegnum op á ytri himnu dýrsins sem kallast Ostia og má líkja við munn. Gegnum flæði svampsins er einungis í eina átt og gæta örþípur (flagellum) þess að vatn fari í rétta átt út úr svampdýrinu á meðan frumur innan veggja svampsins vinna að uppsogi næringarefna og súrefnis úr vökvanum. Vegna sérstakra fæðuöflunar aðferða hjá svampdýrum, lifa þau gjarnan á bakteríum og öðrum örverum úr vatni sem rennur í gegnum holur dýrsins en einnig eru til dæmi um svampdýr sem lifa við matarskort og þá þróast í hrætur sem nærast aðallega á smáum krabbadýrum. Þrátt fyrir að örverur eru gjarnan aðalfæða svampa þá má oft sjá samlífi milli þeirra og ljóstillífangi baktería sem bætir líf

beggja aðila. Ástæða þess er að samlífið myndar frekar meira af fæðu og súrefni heldur en þegar þau lifa án hvors annars (Vacelet og Duport, 2004).

Þessi sérstöku dýr geta verið afkastamikil þegar kemur að framleiðslu fjölbreyttra lífvirkra efna (Garcia-Dav, Munoz-Ocho, Rivas-Mora og Viveros-Va, 2018). Á hverju ári bætist ný efni í hóp þeirra sem framleidd eru af svömpum og örverum tengdum þeim en hægt er að tengja að minnsta kosti 5300 af náttúrulegum efnum beint við svampa. Meðal þeirra eru hópar af óvenjulegum núkleótíðum, sterólar, fitusýrur og amínósýru afleiður sem eru gjarnan halógenaðar (halogenated). Mörg af þessum efnum hafa sýnt fram á lyfjafræðilegar verkanir sem geta verið þá meðal annars krabbameinshrindrandi, ónæmisbælandi, sveppa-, bakteríu- og bólgueyðandi áhrif (Amina og Musayeib, 2018).

1.4 Agar

Agar eða agar-agar er flókin lífmassi sem samanstendur af agarósi og agaropektín sameindum. Agarósi, sem er aðalbyggingareind agars eða um 70% af lífmassa þess (Torres, Flórez-Fernández og Domínguez, 2019). Bygging agarósa sem sjá má á mynd 2, samanstendur af endurtekningum á tveimur einsykrunum þ.e. β -D-galaktósa og 3,6-anhydro- α -L-galaktósa (3,6-AG) með breytilegum hliðarhópum. Agaropektín hefur svipaða byggingu líkt og agarósi nema hefur að auki súlfoxý, metoxý og pýruvat hópa í stað hýdroxýl hópa (Fu og Kim, 2010).



Mynd 2 : Bygging agarósa (Fu og Kim, 2010).

Agar finnst gjarnan í rauðum þörungum sem og öðru sjávarfangi. Í rauðum þörungum gegnir agar hlutverki sem kolefnisbygging í frumveggjum plöntunnar, þar sem hann getur einnig reynst nytsamlegur í jónaskiptum og í stjórnun flæðis gegnum frumhimnur. Agar er þekktastur í gel formi og er hann ekki uppleysanlegur í köldu vatni en bráðnar léttilega við aukinn hita. Sem dæmi er 1,5% agarlausn í föstu gel-formi við 32-39°C sem bráðnar ekki fyrr en það hefur verið hitað í meira en 85°C (Selby og Whistler, 1993).

Árið 1882 var Koch fyrstur manna til að nota agar fyrir bakteríuræktir sem er enn þá gjarnan notað í dag en þetta hafði gríðarleg áhrif á framleiðslu agars og jókst hún hratt vegna mikillar eftirspurnar (Zimbro, Power, Miller, Wilson og Johnson, 2009).

Agar er auðug næringarauðlind sem hefur í margar aldir nýst í matargerð og þá aðallega hjá austurlenskum þjóðum. Í kringum aldamótin 1900 varð agar vinsælt hleypiefni og varð þannig náttúrulegur staðgengill gelatíns úr plönturíkinu. Í dag er agar gjarnan notaður í matarframleiðslu þar sem stöðuleiki byggingareiningarinnar og hlaupkenndur eiginleiki hans nýtist, en sem dæmi þá er agar notaður í osta, hlaup og sykurpúða (Kim o.fl., 2011).

1.5 Ensím

Sjávartengd ensím

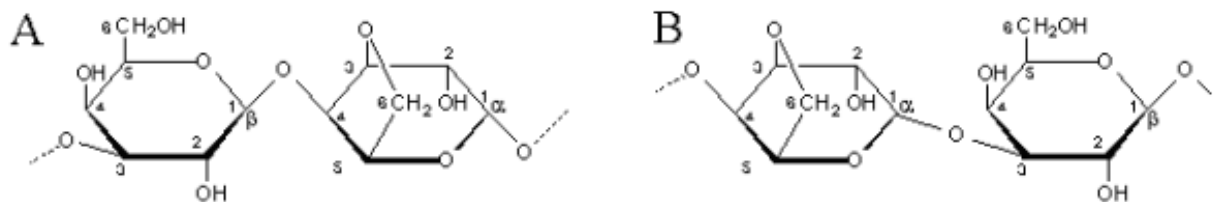
Ef skoðuð eru sjávartengd ensím þá kemur í ljós að þau hafa oft yfirburði ef miðað er við sambærileg ensím sem finnast annarsstaðar, þar með talið er lífefnafræðilegur breytileiki, massaræktunargeta, erfðabreyting, frekari hvatavirkni og sjálfbærni, ásamt öðrum eiginleikum ensíma (Jahromi og Barzkar, 2018). Þessi ensím geta unnið sem hvetjandi þáttur í niðurbroti fjölsykra í þörungum eins og agar. Niðurbrot agars með ensímsins agarasa, framleiðir fásykrur sem geta reynst góðar í ýmsa iðnaði. Þessar fásykrur, hvort sem þær hafa verið fengnar með efnafræðilegri aðferð eða ensínum, hafa verið nýttar í fjölbreyttan iðnað eins og snyrtivörur, lyf og fiskeldi. Í lyfjaiðnaðinum eru sykrurnar notaðar sem andoxunarefni (anti-oxidants), bólgu-, vírus- og bakteríueyðandi, styrkjandi fyrir ónæmiskerfið og jafnvel krabbameinseyðandi. Fyrir matvælaíðnaðinn, nýtist fásykrurnar í brauð- og bjórframleiðslu sem dæmi, en þær hafa líka reynst góðar í ýmsum megrunarkúrum eins og agarinn sjálfur. Að auki, í snyrtiiðnaðinum, eru brotnu fjölsykrurnar vel notaðar sem rakagefandi og hvítandi efni sem virkar bæði á skinn og sortufrumur (melanocells) (Jahromi og Barzkar, 2018). Í rannsóknarvinnum er agarósi gjarnan notaður þar sem bygging hans er einstaklega þolin gegn vatnsrofi ensíma og eiga bakteríur almennt erfitt með að brjóta niður það, fyrir utan þær bakteríur sem geta framleitt α - og β -agarasa sem gerir þeim kleift að klífa byggingu agarósa í sundur. Því er agar gjarnan notaður í rannsóknir á t.d. örverum þar sem hann myndar sterkt gel án katjóna. Þessi eiginleiki agars hefur gert hann ómótstæðilegan fyrir rannsóknir þegar kemur að bakteríuræktum, DNA rafdrátti og annarri hugsanlegri nýtingu hans (Armisen, 1991).

Mikil vöntun er á nýjum staðgöngu ensímum fyrir iðnað sem notar úreltar aðferðir sem geta verið dýrar og orkufrekar. Í nútímasamfélagi er verið að leitast stöðugt eftir auðveldari, ódýrari og orkusparandi aðferðum í almennri framleiðslu sem hægt væri að bæta með nýtingu ensíma (Jahromi og Barzkar, 2018).

Agarasi

Agarasi er sjávarensím sem hefur verið einangrað úr mörgum tegundum lífvera og umhverfissýna, meðal annars sjó og þara svo eitthvað sé nefnt. Þetta ensím sem hvetur vatnsrof og þannig niðurbrot á agar/agarósa í fásykrur (oligosaccharides) sem hafa ýmsa lífvirkni. Þó svo agarasi virðast aðallega finnast í sjávertengdu fangi finnst hann víðar í náttúrunni líkt og í fersk vatni eða jafnvel jarðvegi (Fu og Kim, 2010).

Greina má agarasa í tvær gerðir ensíma sem aðgreinist í α - og β -agarasa en þær einkennast af klofningar munstri sem þýðir að þau eyða út annaðhvort α - eða β -tengjum agarsins (Fu og Kim, 2010). Þá tengist 3,6 AG við galaktósanum með alfa og beta tengjum á ákveðum kolefnum þ.e. alfa 1-3 eða beta 1-4 (Berg, Tymoczko og Stryer, 2002). Þau mynda tvennskonar efni þ.e. agarobíósi og neoagarobíósi sem sést á mynd 3 þar sem A er táknað fyrir agarobíósi og B fyrir neoagarobíósi (Fu og Kim, 2010).



Mynd 3 : Bygging agarobíósi (A) og neoagarobíósi (B) (Fu og Kim, 2010).

Bakteríur sem hafa agarasi virkni eru gjarnan ræktaðar á marine agar með agarose sem eina kolefnisgjafa. Bakteríur sem innihalda agarasi ensím mynda þá oft holur í agarinn sem tákna fyrir niðurbrotsferli ensímsins. Lugol's iodine lausn er oft notuð til að skima eftir agar en með þessari aðferð sést augljóslega hvort ensímið sé virkt og til staðar, það að segja með því að skoða hvort agarinn sé heill eða niðurbrotinn með vatnsrofi (Fu og Kim, 2010).

Myndefni agarasa er hægt að nýta á marga vegu eins og hefur komið fram áður. Rannsóknir hafa sýnt fram á að agarobíósi og neoagarobíósi hafa áhrif á bæði lífeðlis- og líffræðilega starfsemi hjá mönnum. Sem dæmi hefur það sýnt fram á áhrif á krabbamein og þætti þess sem

hægir þannig á ferli sjúkdómsins. Agarbíósi virðist líka vera hugsanlegur staðgengill xylitol sem er notað sem gervi sætuefni í stað sykurs. Að auki gæti agarbíósi verið lykill framtíðarinnar í lífoldsneytis framleiðslu úr agar sem gæti komið í stað jarðefnaeldsneytis, hvort sem það verði að hluta til eða alfarið (Park, Lee og Hong, 2020). Með þetta í huga er mikilvægt að kanna og skilja bæði ensímvirknina og myndefnin svo hægt sé að nýta þau sem best í framtíðinni.

2 Aðferðir og efni

2.1 Stofnar og æti

Sýni voru fengin frá Arnheiði Eyþórsdóttur en hún hafði safnað þeim fyrir M.Sc. verkefnið sitt. Upprunalega voru sýni tekin úr svömpum umhverfis hverastrýturnar og bakteríur einangraðar úr þeim, ræktaðar upp og settar í frysti eftir notkun.

Eftir að hafa legið óhreyfðar í frysti í nokkur ár voru valdir stofnar teknir, alls 32 stofnar (upptalning í *viðauka 1*) og sáð í ýmis æti til að ná upp ræktun. Val á stofnum var einfalt en það fór eftir því hvort þeir höfðu grafið sig niður í agar úr fyrri rannsókn sem benti þá á að stofnarnir hefðu hugsanlega agarasi ensím sem leitast var eftir. Búin voru til alls fjögur æti þ.e. International *Streptomyces* project 2 (ISP2), ISP 2 broth, Marine agar (MA) og Marine broth (MB) samkvæmt framleiðanda (Difco™) til að fá upp ræktun stofnanna. Allir stofnarnir voru ræktaðir við 15°C í rannsóknarverkefni Arnheiðar og réð það upphaflega ræktunarhitastiginu. Ákveðið var að sá stofnunum tvöfalt og rækta upp sýnin bæði við 15°C og við stofuhita bara til að sjá hvort það hefði áhrif á stofnanna. Stofnarnir uxu hægt við 15°C miðað við þá stofna sem voru við stofuhita og því var ákveðið að færa þá í heitara umhverfi þ.e. 30°C sem hjálpaði við vöxt og einangrun stakra kólónía.

2.2 Greiningarpróf

Ýmsar vaxtartilraunir voru gerðar á stofnunum til að meta eiginleika og skilja betur hvaða bakteríur þetta væru. Stríkað var á sex gerðir agarskála til að kanna vöxt bakteríanna á ýmsum ætum og voru þær eftirfarandi :

- Eosin methylene blue agar (EMB)
- MacConkey's agar (MAC)
- Starch agar
- Phenylethyl alcohol agar (PEA)
- Mannitol salt agar (MSA)
- Brilliant green agar (BGA)

Eftir 2 daga ræktun við 30°C voru skálarnar skoðaðar og voru niðurstöður bæði metnar á ræktum sem mynduðust og svo þar sem engir stofnar ræktuðust.

Framkvæmdar voru tilraunir til að skilgreina betur eiginleika stofnanna. Gerðar voru Gramlitun, KOH „sting“, API 20E, Oxidasa- og katalasapróf. Samkvæmt tilraunum voru stofnarnir ekki hreinir og þurfti því að strika á nýjar MA plötur til að fá hreinræktun áður en haldið var áfram með rannsóknina. Gramlitun var framkvæmd aftur eftir hverja ræktun þangað til að hægt var að staðfesta að stofnarnir væru orðnir hreinir og tilbúnir fyrir raðgreiningu.

API 20E var framkvæmt samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda og geymd við sérstök hitastig fyrir hverja og eina bakteríu, þ.e. stofn L104-1, L104-2 og L104-4 voru geymdir við 15°C en hinir stofnarnir, L104-3 og L206-53, við herbergishita.

2.3 16S rDNA greining

Gerð var tegundagreining á fimm stofnum með raðgreiningu 16S rDNA gensins og borið saman við niðurstöður úr prófunum. Það var gert með því að framkvæma kólóníu PCR, þar sem kólóníur af viku gömlum ræktum voru teknar og komið fyrir í lysis buffer (1 kolónía í 50µL af lysis buffer). Til að sundra frumum fyrir PCR mögnun, var lausnin hituð í 70°C í 5 mín í hitabaka með hristing. Gerð var svo 16S rDNA mögnun með *Taq* polymerasa og almennum vísapörum það er að segja 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') og 1492R (5'-GGTTACCTGTTACGACTT-3') (Chen o.fl., 2015). Fyrir hvert sýni var útbúið 25 µL af PCR lausn þ.e. 2,5 µL 10xbuffer, 1,5 µL dNTP, 1 µL af báðum prímerum, 0,125 µL af *Taq* polymerasa, 13,88 µL af dH₂O og 1 µL af DNA sýni. Keyrt var PCR sýni í 35 hringi samkvæmt ákveðnu kólóníu PCR ferli sem má sjá í *töflu 1*.

Tafla 1 : Kólóníu PCR ferlið

Þáttur	Hiti (°C)	Tími
Fyrsta bræðsla sýnis	95	5 mín
Bræðsla	95	30 sek
Prímerabinding	50	30 sek
Lenging	68	90 sek
Lokalenging	68	7 mín

Í Lok keyrslurnar var sýnið geymt við 4°C þangað til rafdráttargel var tilbúið fyrir rafdrátt. Rafdráttur var notaður til að staðfesta að PCR mögnunin hafi tekist og voru því sýnin dregin í gegnum 2% agrósagel við 110V, 200mA í 40 mín. Gel var skoðað undir UV lampa og notaður var 100 bp ladder til viðmiðs.

PCR afurðin var hreinsuð með ExoSAP þar sem notuð eru tvö ensím þ.e. Exonucleasi og Shrimp Alkaline Phosphatase, til að undirbúa sýnið fyrir raðgreiningu. Fyrir hvert sýni þurfti að undirbúa ExoSAP mastermix þ.e. 0,025 µL af Exonuclease I, 0,050 µL af Shrimp alkaline phosphatase og 9,925 µL af dH₂O. Notað var 25 µL af PCR afurðinni (DNA) með 10 µL af ExoSAP mixinu og sett í annað PCR prógramm sem kallast „Exo80“ þ.e. 15 mín við 37°C, 15 mín við 80°C og loks 4°C „forever“.

Loks var sett 7,5 µL af ExoSAP PCR afurðinni og 2,5 µL af einum prímer í eppendorf glas sem varð þá tilbúið til raðgreiningar. Raðgreining var framkvæmd af Macrogen í Hollandi.

Farið var handvirkt yfir raðgreiningargögnin og þau borin saman við 16S rRNA gagnagrunna með bæði EZ BioCloud og NCBI forritum. Tegund var svo valin út frá þeim niðurstöðum.

2.4 Ensímvirkni

Fyrst þegar stofnarnir voru ræktaðir í meistaraverkefni Arnheiðar, sást greinilega að sumir stofnanna grófu sig niður í agar. Þá vaknaði þá upp hugmyndin að stofnarnir gætu verið með agarasa ensímvirkni og því var ákveðið að skima fyrir því.

Til að staðfesta agarasa ensím vikni er notuð Lugol's lausn til að lita agar sem hefur ekki verið niðurbrotinn. Lugol's jodlausninni var hellt á marine agar skálina með viðeigandi bakteríuræktum og leyft að sitja í nokkrar mínútur eða þangað til að lausnin hafði örugglega litað agarinn sem hafði ekki verið niðurbrotinn. Lugol's lausninni var svo hellt af þegar greinilegar litabreytingar urðu á ætinu. Þá stóð eftir glær geislabaugur (halo) í kringum bakteríurnar eða þar sem agarinn hefur verið niðurbrotinn eins og má sjá á mynd 4. Þessi aðferð var framkvæmd tvisvar sinnum þ.e. við stofna sem höfðu verið ræktaðir við 15-20°C og svo aftur 30°C.

Einnig var notuð API ZYM strippa til að skilja betur ensím virkni stofnanna. API ZYM strippa er oft notuð til að skoða allskyns ensímvirkni en alls 20 brunnar sem allir tákna ákveðin ensím. API ZYM var framkvæmt samkvæmt fyrirmælum framleiðenda og hún geymd við sérstök hitastig fyrir hverja og eina bakteríu, þ.e. 15°C fyrir L104-1, L104-2 og L104-4 en hin (L104-3 og L206-53) voru geymd við herbergishita. Hitastigin voru ákvörðuð eftir umhverfis aðstæðum sem bakteríurnar voru að ræktast upp við þegar prófin voru gerð.

3 Niðurstöður

Einungis kom upp rækt í marine ætum eftir 2 vikur í 15°C og stóðu eftirfarandi 5 stofnar af 32 sem náðu sér eftir frystirinn :

- L104-1
- L104-2
- L104-3
- L104-4
- L206-53

3.1 Greiningarpróf

Eftir 2 daga ræktun við 30°C sást einungist vöxtur hjá stofni 206-53 á ræktunarskálunum. Upp kom rækt hjá stofni 206-53 á MAC, MSA og BGA. MAC eða MacConkey agar er oft notaður fyrir laktósagerjandi bakteríur en agarinn og bakteríurnar litast við sýrustigsbreytingar (Jung og Hoilat, 2021). MSA eða Mannitol salt agar er tilvalin til að kanna hvort stofnarnir séu saltkærir (halophilic) og hvort þeir geti hvatað gerjun til að mynda mannitol (Chapman, 1945). BGA eða Brilliant green agar segir til um hvort bakterían er laktós- eða súkrósgerjandi með litabreytingum agarsins úr rauðum yfir í gulan. Út frá þessum niðurstöðum má segja að bakteríustofninn er saltkær, laktósa-/súkrósa- og mannitolgerjandi bakteríustofn (Moats og Kinner, 1974).

Eins og kom fram í framkvæmd voru gerðar litlar tilraunir á 5 stofnum, bakteríurnar voru skoðaðar í smásjá, Gramlitun, KOH „string“, Oxidasapróf og Katalasapróf en niðurstöður tilraunanna má sjá í *töflu 2*.

Tafla 2 : Niðurstöður úr litlum tilraungum (gramlitun, KOH "string" o.fl.)

Stofnar	Frumulögun	Gramlitun	KOH „string“	Oxidasapróf	Katalasapróf
L104-1	Stafir	Neikvætt	Jákvætt	Jákvætt	Jákvætt
L104-2	Stafir	Neikvætt	Jákvætt	Jákvætt	Jákvætt
L104-3	Stafir	Neikvætt	Jákvætt	Jákvætt	Jákvætt
L104-4	Stafir	Neikvætt	Jákvætt	Jákvætt	Jákvætt
L206-53	Kúlulaga	Neikvætt	Jákvætt	Jákvætt	Jákvætt

Í gramlituninni kom fram að allir stofnarnir voru gram-neikvæðir því þeir voru rauðir/bleikir undir smásjá eftir litun. Gram-neikvæðar bakteríur hafa einungis þunnt peptidoglycan lag með ytri himnu úr lípíði á meðan gram jákvæðar bakteríur hafa þykkt peptidoglycan lag en ekkert ytra lag (Silhavy, Kahne og Walker, 2012). Með því að framkvæma KOH „string“ tilraun var hægt að staðfesta að bakteríurnar voru gram neikvæðar. Undir smásjá sást einnig að bakteríurnar voru allar staflaga nema stofn L206-53 sem var kúlulaga. Oxidasa- og katalasaprófin komu fram jákvæð sem þýðir að bakteríurnar eru með bæði ensímin katalasa og oxidasa. Ekki fannst nein vikni í API 20E strippunni.

3.2 Ensímvirkni

fyrir API ZYM strippuna var farið eftir lita staðli en hann er notaður til að túlka niðurstöður eftir nanomólum (*tafla 3*) og sést virkni bakteríanna í *töflu 4*.

Tafla 3 : Staðalar í nanomólum

Staðall	Nanomól
0	0 nanomól
1	5 nanomól
2	10 nanomól
3	20 nanomól
4	30 nanomól
5	>40 nanomól

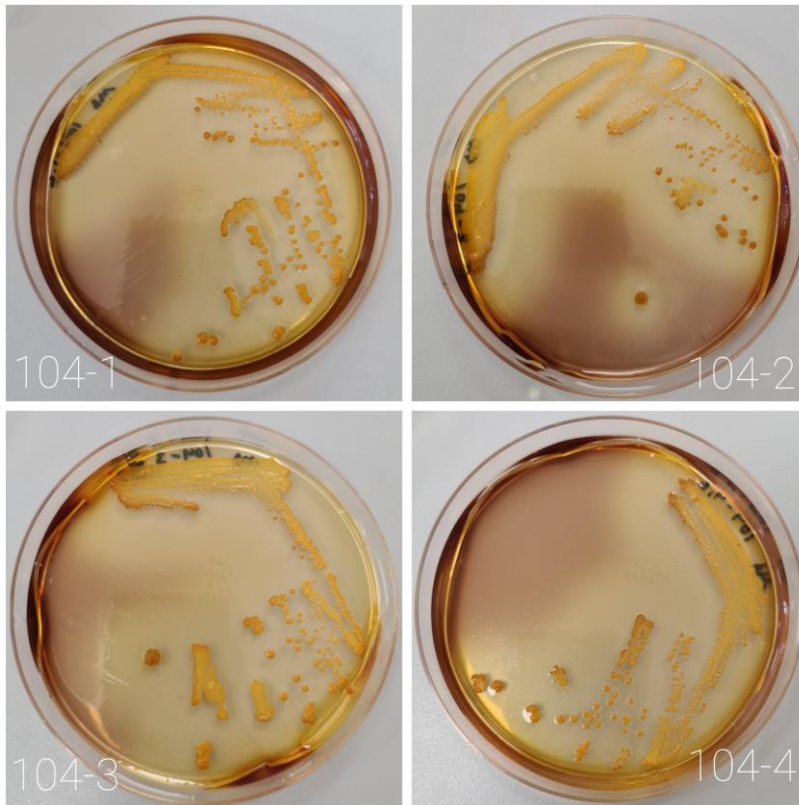
Tafla 4 : Niðurstöður úr API ZYM

Ensím	Stofnar				
	L104-1	L104-2	L104-3	L104-4	L206-53
Kontróll	0	0	0	0	0
Alkaline phosphatase	5	5	5	4	5
Esterase (C4)	1	3	3	3	4
Esterase lipase (C8)	3	3	2	1	3
Lipase (C14)	1	0	0	1	1
Leucine arytamidase	3	1	1	1	0
Valine arylamidase	0	1	1	1	1
Cystine arylamidase	0	0	0	1	0
Trypsin	0	2	2	0	1
α -chymotrypsin	1	0	0	0	0
Acid phosphatase	0	0	0	1	1
Naphthol-AS-BI-phohydrolase	0	1	1	4	1
α -galactosidase	1	0	0	1	2
β -galactosidase	0	0	0	1	0
β -glucuronidase	0	0	0	0	0
α -glucosidase	0	1	1	0	2
β -glucosidase	0	0	0	0	0
N-acetyl- β -glucosaminidase	2	2	0	0	0
α -mannosidase	1	1	0	0	1
α -fucosidase	0	0	0	1	1

Ef litið er einungis á þau ensím sem náðu staðli sem nam þremur eða hærra, þá eru það eftirfarandi ensím :

- Alkaline phosphatase (brunnur 2) var virkt hjá öllum og með mikla virkni
- Esterase (C4) (brunnur 3) sást hjá öllum nema L104-1
- Esterase lipase (C8) (brunnur 4) kom jákvætt hjá L104-1,2 og L206-53
- Valine arylamidase (brunnur 6) sýndi virkni einungis hjá L104-1
- α -Galactosidase (brunnur 12) var einungis hjá L104-4

Stofnar L104-1 til L104-4 höfðu virk agarasi ensím við 30°C eins og má sjá á mynd 4. Lugol's



lausnin bindur sig aðeins við þann part ætisins þar sem enn er óniðurbrotinn agar. Þá sést á glæra parti ætisins hvar agarasi ensímin hafa brotið niður agarinn.

Mynd 4 : Niðurstöður úr Lugol's lituninni



Stofninn 206-53 hafði hins vegar ekki ensím virknina og varð því skálin öll dökk eins og má sjá á mynd 5.

Mynd 5 : Niðurstöður úr Lugol's lituninni fyrir stofn L206-53

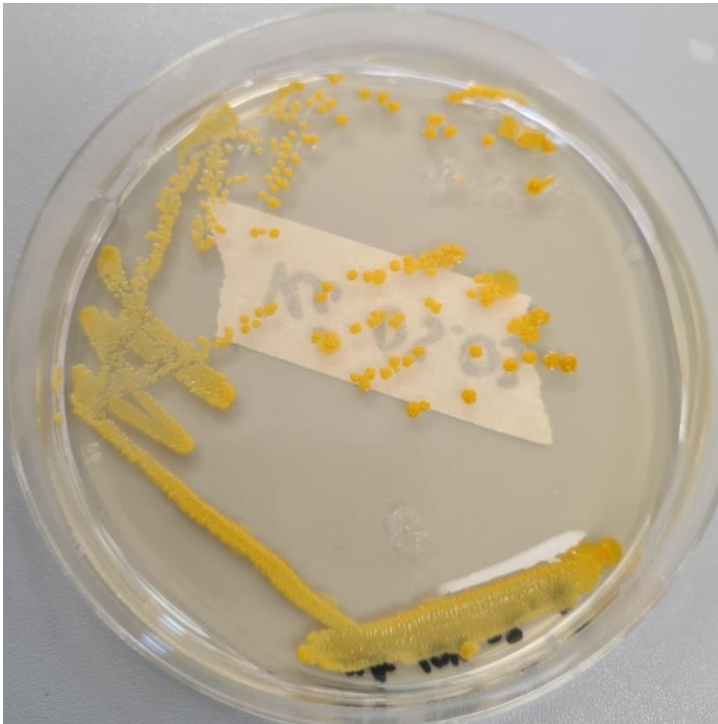
3.3 16S rDNA greining og stofnar

L104-1

Stofn L104-1 óx vel á marine agarinum eins og má sjá á mynd 7. Allir stofnar sem merktir voru L104 litu út eins í marine broth, sem sést á mynd 6.

Fengnar voru tvær raðir úr raðgreiningu á 16S rDNA geni stofnsins með sitthvorum primerinum. Samkvæmt hlutaraðgreiningu, tilheyrir stofninn *Cellulophaga* ættkvíslinni og er röðin með 93,91% einsleitni fyrir *Cellulophaga fucicola* ef skoðaður var rDNA fyrir reverse prímerinn sem var 1397 basa pör að lengd. Forward prímerinn, sem var 1170 bp, gaf ekki eins góðar niðurstöður þar sem einsleitni gensins var um 82,73% fyrir sama bakteríustofn.

Eftir að hafa skeytað saman forward og reverse röðunum saman til að fá sem heillegasta bít sem mögulega var hægt að fá með ClustalW algorithmna. Var hægt blasta þeirri röð við NICB gagnagrunninn og úr því kom fram 96,86% einsleitni milli raðarinnar og 16S rDNA raðar hjá *Cellulophaga fucicola*. Einnig var þetta gert fyrir hina stofnanna til að fá eins nákvæmar niðurstöður og hægt er að fá með þessum upplýsingum.



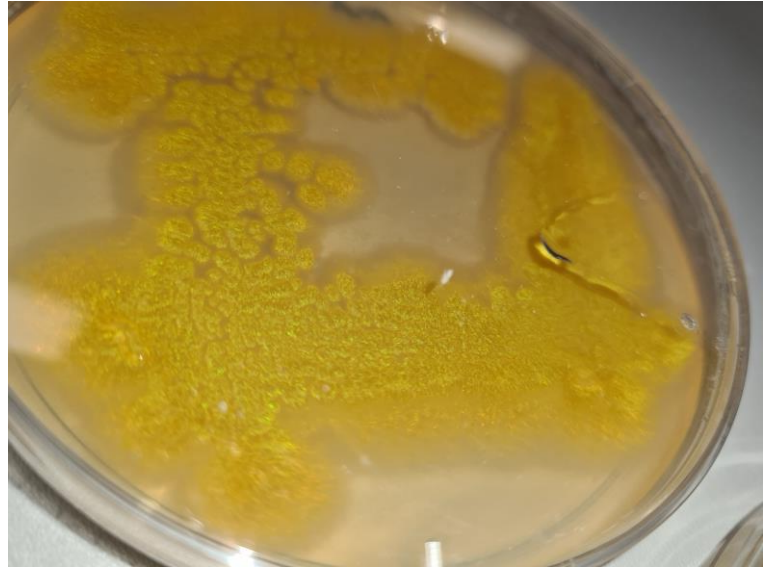
Mynd 7 : Stofn L104-1 á marine agar



Mynd 6 : Stofn L104-1 í marine broth

L104-2

L104-2 var stofninn gulleitur með örlitlum málmlikum blæ á marine agar, eins og má sjá á mynd 8. Lengri röðin sem var 1381 bp úr sýninu sem hafði reverse prímerinn, sýndi að genið var 94,77% líkt *Cellulophaga fucicola* en það var líkast. Forward sýnið hafði 1152 bp og sýndi 86,80% líkindi við gen hjá sama stofni.



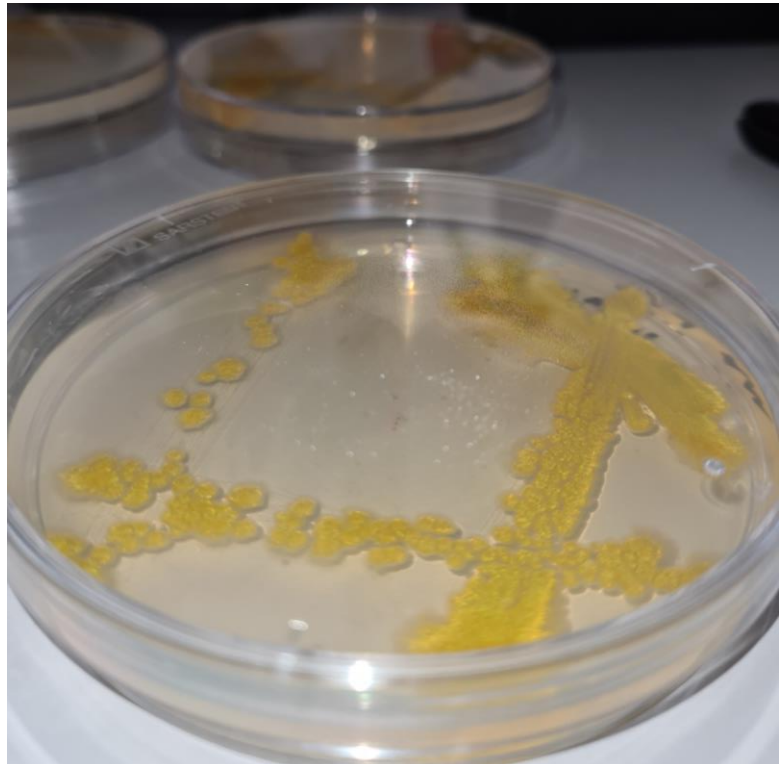
Með samröðun beggja raða með ClustalW algóripmi fékkst út 98,36% einsleit röð við 16S rRNA gen hjá *C. lytica*.

Mynd 8 : Stofn L104-2 á marine agar

L104-3

Sjá má stofninn á marine agar á mynd 9.

16S rDNA greining sýndi 93,95% einleitni fyrir *Cellulophaga fucicola* ef skoðaður er rDNA fyrir reverse prímerinn sem var 1379. Forward röðin sem hafði 1249bp sýndi að stofninn var með 72,25% einleitni við *Celluophaga lytica*.



Eftir samröðun með ClustalW algóripma fékkst út 98,20 % einsleitni milli samröðunnar og 16S rRNA geni hjá bakteríu án vísindalegs nafns en er merkt „marine bacterium“.

Mynd 9 : Stofn L104-3 á marine agar

Næst líkust er 16S rRNA gen hjá *C. fucicola* sem hefur 96,98% einsleitini.

L-104-4

Eins og á áður nefndum stofnum, eru kólóníur gular og stundum með málmíkan blæ, sem gerist við sérstakar aðstæður, sjá mynd 10.

Cellulophaga fucicola var líkast 16S geni stofnsins en fyrir reverse röðina, sem var 1357 bp, var samröðunin 96,28% og fyrir forward sem var 1157 bp, fékkst einungis 83,36%.

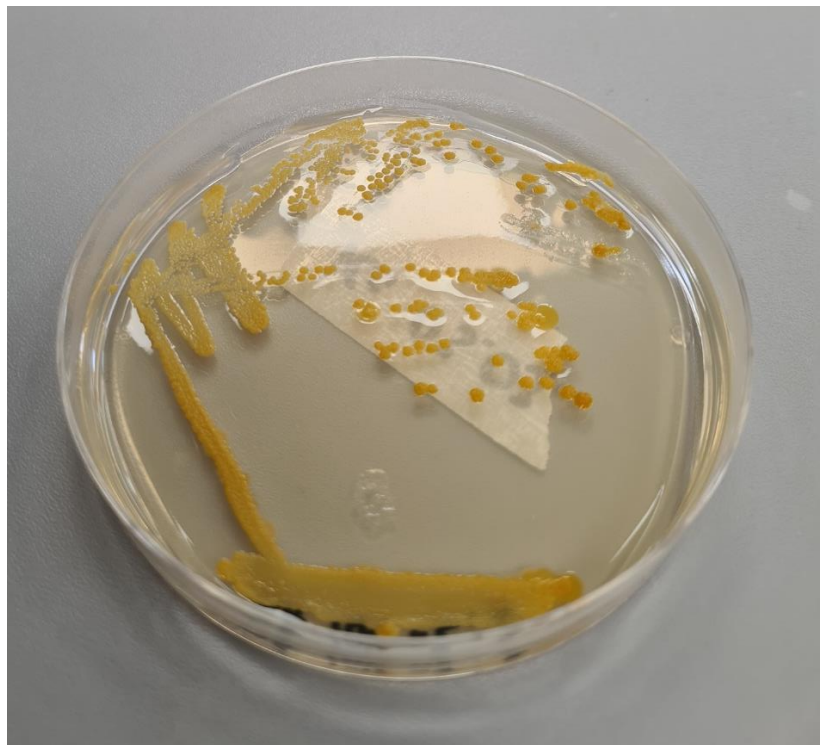
Samkvæmt BLAST, var samröðun forward og reverse raðarinnar

98,25% einsleit við 16S rRNA geni *C. fucicola*.



Mynd 10 : Stofn L104-4 á marine agar

Allir stofnar merktir L104 sýndu einhverskonar agar niðurbrot á marine agar en þá mynduðust dældir/holur í ætið, umhverfis kólóníurnar eins og sjá má á mynd 11.



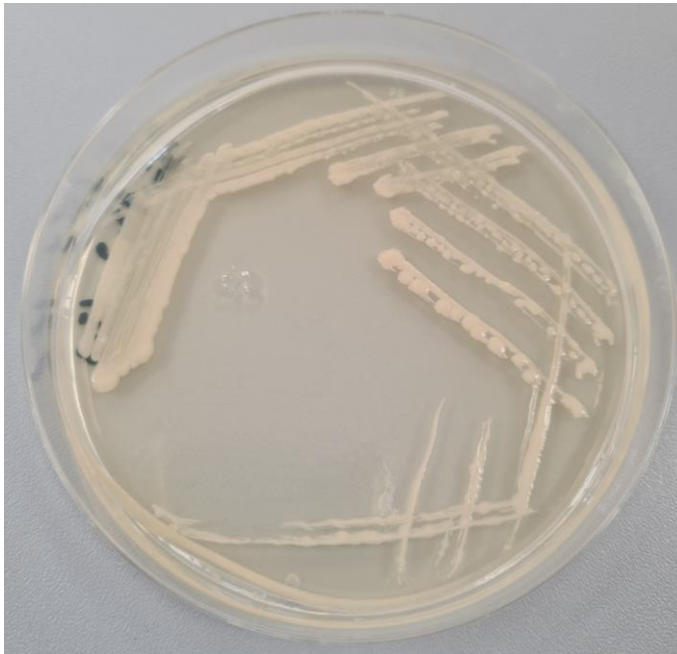
Mynd 11 : Sjáanlegt niðurbrot agars á marine æti

L206-53

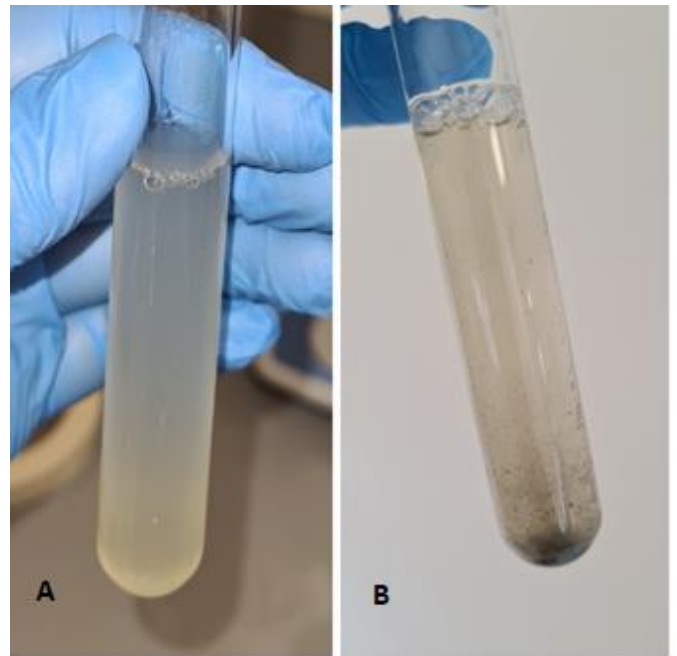
Samkvæmt hlutraðgreiningu, tilheyrir stofninn *Vibrio* ættkvíslinni. Reverse röðin (1421 bp) sýndi fram á 95,48% einsleitni þegar borið var saman röðina við *Vibrio variabilis* og 93,26% við *Vibrio sagamiensis* þegar skoðuð var forward röðin sem var þá 1405 bp.

Þegar blastað var samröðun raðanna við gagnagrunn NCBI, fékkst út að 16S rRNA gen *Vibrio alginolyticus* er 98,18% líkt röðinni sem fékkst út úr sýninu.

Á mynd 12 sést rækt stofnsins á marine agar og á mynd 13 sést stofninn í marine broth. Á mynd 13 sést litaskipti stofnsins sem hafði legið nánast óhreyfður í dimmum kæliskáp við 15°C í u.þ.b. mánuð. Þá breytist liturinn úr ljós-skýjaðri vökvarækt (A) yfir í dökka botnfallna rækt (B).



Mynd 12 : Stofn L206-53 á marine agar



Mynd 13 : Stofn L206-53 í marine broth

4 Umræður

4.1 Ensímvirkni

Úr Api ZYM strippunni sést alkyns ensímvirkni og var virknin litakóðuð í tölur til að tákna fyrir virkni þeirra eftir stofnum.

- Alkaline phosphatase sýndi frekar mikla virkni þ.e. >40 nanomól hjá flestum.
- Esterase virknin var um 20-30 nanomól hjá stofnum L104-2,3,4 og 206-53.
- Esterase lipase sýndi ekki meiri virkni en 20 nanomól hjá virkustu stofnunum.
- Valine arylamidase sýndi fram um einungis 20 nanomóla virkni hjá L104-1.
- α -Galactosidase kom á óvart en sýndi um 30 nanomóla virkni hjá L104-4.

Athyglisvert væri að framkvæma Api ZYM aftur til að sjá hvort önnur hitastig hefðu áhrif á niðurstöður ensímvirknarinnar.

Agarasi ensímvirkni

Eins og má sjá á mynd 4, sést hvar agarasi ensímvirknin var til staðar. Það sést á glæru hringjunum sem mynduðust í kringum þær bakteríur sem höfðu agarasa. En ástæðan fyrir því er að Lugol's lausnin gat ekki litað þann part af agarinum sem var niðurbrotinn. Þegar stofnar sem höfðu verið teknir úr frystinum og ræktaðir við 15°C sýndu ekki mikila sjáanleg ensímvirkni þ.e. bakteríurnar grófu sig ekki niður í agarinn. Um leið og stofnarnir voru færðir í heitara umhverfi breytist hegðun þeirra, en ensímvirknin varð meiri þegar umhverfishiti var hækkaður (sjá niðurbrot agars á mynd 11). Hins vegar sýndi 206-53 stofninn ekki fram á neina ensím virkni hvort sem skoðað var lægra eða hærra hitastigið enda er hann töluvert frábrugðin hinum stofnunum.

4.2 Stofnar

Með upplýsingum sem hafa komið fram í niðurstöðum, gefa þær til kynna staðreyndir um eftirfarandi stofna :

Ef skoðuð er raðgreiningin og borið saman við aðrar niðurstöður virðast stofnarnarnir L104-1, L104-2 og L104-4 tilheyra sömu tegund baktería þar að segja *Cellulophaga fucicola*.

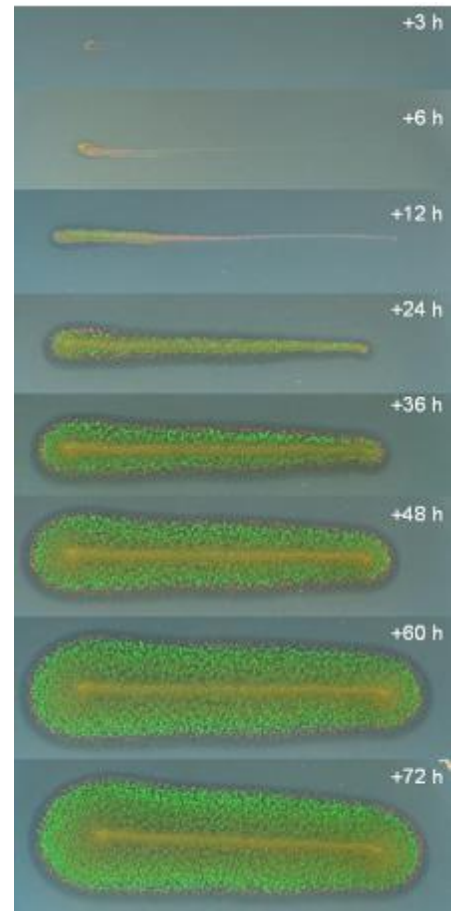
Almennt um *Cellulophaga*

Cellulophaga ættkvíslin er hópur baktería sem eru gram-neikvæðar, loftháðar og staflaga. Þessi ættkvísl baktería flokkast undir mesophilic eða miðlungshitakærar bakteríur. Þær lifa við loftháðar aðstæður sem gerir þær að aerobic eða loftháðar og þýðir það að þær verða að hafa súrefni til að lifa. Ættkvíslin er þekkt fyrir sínar gul-appelsínugulu bakteríur sem ræktast vel á marine agar og hvernig þær leysa upp agar auðveldlega með því að seyta út agarasa ensínum til að brjóta niður agar. Á ákveðnu tímabili geta kólóníur bakteríunnar haft litaskipti á söltum agar eins og marine agar og TSA agar með viðbættu salti (20 %). Þá geta þær myndað grænleitan málmlikan blæ eða ópalbjarma sem má sjá á mynd 14. Ástæða þessara litaskipta er líklegast vegna framleiðslu karotenóíð litarefnis sem kallast zeaxanthin. Zeaxanthin er eitt af þekktustu karotenóíð alkóhólum sem finnast í náttúrunni og gefur það t.d. papriku, maís, saffron og mörgum öðrum plöntum gulan lit sinn (Bowman, 2015).

Cellulophaga ættkvíslin er einstök út af mörgum ástæðum en merkilegasti hæfileiki þeirra er meðal annars hæfileiki til að mynda niðurbrjótandi ensím þeirra. Nafngift ættkvíslarinnar er að einhverju leyti óviðeigandi vegna þess að engar af bakteríunum innan hennar, geta brotið niður cellulósa sem ættkvíslin er nefnd eftir (Johansen, Nielsen og Sjöholm, 1999).

Cellulophaga ættkvíslin tengist *Flavobacteriaceae* ættinni sem finnst aðallega í sjávar tengdum aðstæðum eins og í þara, sjávarlífverum og jafnvel í jarðvegi nálægt sjó (Hamana og Nakagawa, 2001). Innan ættkvíslarinnar eru að minnsta kosti fimm tegundir; *Cellulophaga lytica*, *Cellulophaga algicola*, *Cellulophaga baltica*, *Cellulophaga fucicola*, og *Cellulophaga pacifica* (Bowman, 2015).

C. fucicola er ein af tegundum sem tilheyrir *Cellulophaga*. Hún fær sitt nafn frá brúnum þara, *Fucus serratus*, sem bakterían lifir gjarnan á. Bakteríurnar eru staflaga sem finnast ýmist



Mynd 14 : Litabreytingar hjá *C. lytica* (Kientz, Marié og Rosenfeld, 2012).

út af fyrir sig, í pörum eða jafnvel stundum í röð. Lengd þeirra er um 2,5-4,7 μm og 0,7-0,8 μm í breidd. *C. fucicola* eru gram-neikvæðar bakteríur sem eru ókvikar og hafa loftháð efnaskipti sem gerir þeim ókleift að lifa við loftfirrtar aðstæður. Þær mynda almennt hringlaga og gular kólóníur sem geta sýnt málmlikan blæ við 18-26°C á agarplötum sem hafa einhverja seltu. Þær kjósa að vaxa við 7-8 pH og 2-30°C en lifa best við 26-30°C en enginn vöxtur verður í 32°C eða heitara umhverfi samkvæmt heimildum (Johansen, Nielsen og Sjöholm, 1999).

C. lytica er önnur tegund baktería sem flokkast undir *Cellulophaga* en þær bakteríur sem flokkast undir þessa tegund eru gul-appelsínugular kólóníur með gram-neikvæðum og staflaga frumum sem lifa loftháðu lífi við miðlungshitakærar aðstæður. Það þýðir að þær geta lifað við 20-45°C en þeim hentar best að vera við 30-39°C. Þessi tegund baktería getur hreyft sig, en það getur komið sér vel í aðstæðum sem þær gjarnan lifa við þ.e. í sjó. Samkvæmt gagnagrunni BacDive var þessi baktería fyrst einangruð úr moldarsýni sem var tekið af ströndum Costa ríku (Reimer, Sarda Carbasse, Koblit, Podstawka og Overmann, 2020).

Stofnarnir höfðu gul-appelsínugular kólóníur sem grófu sig niður í agarskálarnar, en *C. fucicola* er þekkt fyrir agar niðurbjótandi ensím sín (Johansen, Nielsen og Sjöholm, 1999). Áður en stofnarnir voru færðir í 30°C, mynduðu þeir málmlikan blæ sem passar við tegundina (Bowman, 2015). Samkvæmt hlutraðgreiningu virtist L104-3 stofninn vera skyldur *C. lytica* að einhverju leiti sem er hugsanlega ekki vitlaust að kanna frekar í framhaldi verkefnisins. Þessi stofn ræktaðist mjög hægt við 15°C ef miðað var við hina stofnanna og tók strax við sér í heitara umhverfi sem þá passar við tegundagreininguna þ.e. bakterían er miðlungshitakær (Bowman, 2015). Einnig var athyglisvert að sjá hvernig þessi stofn hafði miklu meiri sjáanlega agarasi virkni heldur en hinir stofnarnir og benda þá niðurstöður á að hann gæti verið örlítið öðruvísi heldur en hinir stofnarnir.

L206-53 stofninn var einstakur á alla vegu þar sem hann ræktaðist öðruvísi (sjá mynd 12), hafði ekki sama lit og ekki sömu eigileika ef borið var saman við hina stofnanna. Enda sýndu niðurstöður úr hlutraðgreiningu, að hann tilheyrir *Vibrio* ættkvíslinni og þá tengist sérstaklega *V. variabilis* eða *V. sagamiensis*.

Almennt um *Vibrio*

Í vistkerfi sjávar má finna margar ættir baktería eins og Vibrionaceae. Ættkvíslir hennar eru meðal annars *Grimontia*, *Photobacterium* og *Vibrio* en *Vibrio* er stór ættkvísl baktería sem er

vel þekkt og skoðuð. Hún þrífst vel í umhverfi sjávar og í vötnum en hún finnst í nánast öllum vatnskerfum, þ.e. sjó, ferskvatni og vatnsföllum (Carter, 1990).

Bakteríur ættkvíslarinnar eru gram-neikvæðar baktería sem eru stuttar og staflaga en geta oft verið sveigðar eða kommulaga. Þær mynda ekki gró, eru katalasa-jákvæðar og kvikar bakteríur sem geta lifað án súrefnis. Bakteríurnar eru flestar miðlungshitakærar (20-40°C) sem líkar við basakennt eða alkalískt umhverfi og lifa þess vegna best við 6,5-9 pH. Flestar tegundir *Vibrio* hafa oxidasa hvetjandi ensím og geta brotið nítrat í nítrít. (Percival og Williams, 2014).

Meðal hundrað tegunda innan ættkvíslarinnar er hægt að tengja tug þeirra við sjúkdóma í mönnum en meðal þeirra er *V. colerae* þekktust (Arab, Nalbone, Giarratana og Berbar, 2020). *V. alginolyticus* er önnur tegund baktería sem getur valdið alvarlegum sýkingum og sjúkdómum í mönnum en hún er gjarnan tengd við hóp sjúkdómsvaldandi örvera í fisk og skelfisk tegundum. Oft er hægt að tengja sýkingar af völdum *V. alginolyticus* við neyslu á hráum eða illa elduðu fiskmeti sem veldur slæmum meltingarsjúkdómum. Smit af þessu tagi getur komið fram í formi sýkinga, bólga og lifra bilanna svo eitthvað sé nefnt (Kang, Shin, Jang, Jung og So, 2016). Tetrodoxin er eitur sem *V. alginolyticus* myndar og seytir frá sér til að valda skaða í nærliggjandi frumur. Ef sýking bakteríunnar er ekki stöðvuð í tæka tíð getur það leitt til lífhættulegs ástands sjúklings sem síðar deyr vegna eitrunar (Zeece, 2020).

Frumur *V. alginolyticus* eru skilgreindar sem salt- og loftháðar bakteríur sem ræktast vel á hefðbundum ætum frá 10°C til 40°C svo lengi sem þær hafa salt. Þær lifa best við sýrustig rétt fyrir ofan 7 pH þ.e. 7,5-9 pH og mynda þær stórar, vel dreifðar gulleitar kólóníur á TCBS agar (Mustapha, Ennaji og Cohen, 2013).

V. variabilis er önnur tegund undir *Vibrio* ættkvíslinni en hún er talin ekki vera sjúkdómsvaldandi. Nafn þessara bakteríuteygundar þ.e. *variabilis*, gefur til kynna að bakterían breytir um lit þ.e. úr drapplituðum kólóníum, í svartar ef bakterían kemst ekki í snertingu við ljós (Mohamad o.fl., 2016). Frumur bakteríunnar eru gram-neikvæðar og mynda hreyfanlega stafi sem eru um 0,9 µm að breidd og 1,5-2,5 µm að lengd. Þær verða að hálf gagnsæjum, ávöllum, mjúkum kólóníum sem geta breitt úr sér u.þ.b. 1 mm á dag (Chimetto o.fl., 2011).

Margar tegundir *Vibrio* geta verið hvarvetna í vatnstengdum umhverfum og þá sérstaklega í sjó en þá er *V. sagamiensis* tegundin gott dæmi. Hún hefur verið einangruð víða úr mörgum mismunandi lífverum og er nefnd eftir Sagami Bay, þar sem bakterían var einangruð fyrst.

Frumur bakteríurnar eru 1.9 μm breiðar og 1.7-2.0 μm langar, sem gerir þær að coccoid-rods eða stuttum stöfum. Þegar bakterían er ræktuð á TCBS agar myndar hún hringlaga, ávalar grænar kóloníur (Yoshizawa, Wada, Yokota og Kogure, 2010).

Stofninn hafði hvítar/drapplitaðar kóloníur (sjá mynd 12) sem bendir til að stofninn er líkari *V. variabilis* (Mohamad o.fl., 2016), frekar en *V. alginolyticus* sem hefur gular kóloníur (Mustapha, Ennaji og Cohen, 2013), og *V. sagamiensis* hefur grænleitar kóloníur (Yoshizawa, Wada, Yokota og Kogure, 2010). Athyglisvert var að sjá litabreytinguna hjá bakteríunni í marine broth-inu (sjá mynd 13) þar sem engar áreiðanlegar heimildir sýndu fram á að þetta væri þekktur eiginleiki hjá *V. alginolyticus*. Sjáanlegar niðurstöður úr rannsóknum sem gerðar voru á stofninum benda til þess að þetta sé *V. variabilis* þótt raðgreiningin segir annað.

4.3 Næstu skref

Mikilvægt væri að skoða ensímvirkni agarasa frekar með því að framkvæma hvarfhraðarannsóknar greiningu og finna þannig almennar staðreyndir um enímið. Þá væri lykil atriði að einangra og hreinsa ensímið úr bakteríunni sem er forsenda fyrir hvarfhraðarannsóknum. Þá væri hægt að skilja betur af hverju og hvernig ensímvirknin breyttist nákvæmlega við hærra hitastig. Einnig væri mikilvægt að ákvarða ákjósanlegan hita, sýrustig, virkni tíma og almennar kjöraðstæður bæði fyrir bakteríuna og ensímið sjálft. Þessar upplýsingar hjálpa við greiningu ensímsins og þá er hægt að ákvarða betur hvernig það virkar almennt sem best. Athyglisvert væri að skoða einnig API ZYM stippuna og ensím hennar til að ákvarða hvort bakteríurnar gætu framleitt meira af verðmætum ensímum við réttar umhverfis aðstæður. Ástæða fyrir því er að framleiðandi mælir með að API ZYM strippurnar séu notaðar við kjörhitastig bakteríunnar (Laughon, Syed og Loesche, 1982). Bakteríurnar virtust vaxa betur í kringum 30°C heldur en við 15°C og varð agarasa ensímvirkni þeirra meiri við hærra hitastig. Því væri ekki vitlaust að prufa API ZYM strippurnar við hærra hitastig til að sjá muninn.

Einnig væri hægt að athuga betur litabreytingar *Cellulophaga* sem og efnabreytingarnar sem valda því þ.e. karotenóíð zeaxanthin. Einhverjar rannsóknir hafa verið gerðar til að sýna fram á heilsuþætandi áhrif karotenóíða á bæði dýr og mannfólk. Sýnt hefur verið fram á það hafi hamlandi áhrif á langvinnandi sjúkdóma, meðal annars krabbamein og æðakölkun, sem hefur vakið aukin áhuga á nýtingu þess í allskyns iðnaði (Johnson og Schroeder, 2006). Zeaxanthin er gult litarefni sem finnst t.d. í miðju macula í augum manna. Það spilar mikilvægt

hlutverk í augunum, þar sem það verndar þau frá skaðlegum áhrifum frá sterkum ljósgeislum. Einnig hefur verið sýnt fram á að það hafi jákvæð áhrif á t.d. hjarta og æðakerfið ásamt fleirum kerfum líkamans. Einu aukaverkanir sem hægt er að tengja við of mikla upptöku efnisins í líkamun er breyting á húðlit, en hún verður gulleit vegna gula litarefnisins (Murillo, Hu og Fernandez, 2019). Í dag er Zeaxanthin mikið notað sem fæðubóta- og litarefni í matvælaíðnaði fyrir fugla, svín og fiska. Litarefnið hefur áhrif á litarafbrigði skins hjá dýrunum og gefur eggjarauðum fallettri gulan lit (Sajilata, Singhal og Kamat, 2008).

Ef skoðaður er markaðurinn fyrir karotenóíð þá er augljóst að það stefnir í dýrmæta framleiðslu í framtíðinni og eru veðbankar að spá um að virði markaðsins nái u.þ.b 1.890,6 milljónum bandaríkja dala árið 2024 (Market Research Future, 2021).

Vegna aukinnar heilsueflingu manna um allan heim væri ekki vitlaust að nýta þennan sérstaka litarhátt *Cellulophaga* og reyna að fá bakteríurnar til þess að framleiða meira, sem væri hægt að einangra og nýta í allskonar iðnaði eins og t.d. fôrþunarförur eða matvæli.

Heimildir

- Amina, M. og Musayeib, N. A. (2018). Biological and medicinal importance of sponge. Í R. Sajal (ritstjóri), *Biological resources of water* (bls. 200-215) Books on demand. doi:10.5772/intechopen.73529
- Joseph, A. (2017). Seafloor hot chimneys and cold seeps: Mysterious life around them. *Investigating seafloors and oceans* (bls. 307-375) Elsevier Inc. doi:10.1016/B978-0-12-809357-3.00006-0
- Arab, S., Nalbone, L., Giarratana, F. og Berbar, A. (2020). Occurrence of vibrio spp. along the algerian mediterranean coast in wild and farmed sparus aurata and dicentrarchus labrax. *Veterinary World*, 13(6), 1199-1208. doi:10.14202/vetworld.2020.1199-1208
- Armisen, R. (1991). Agar and agarose biotechnological applications. *International workshop on gelidium* (bls. 157-166). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-3610-5_15
- Bellec, L., Cambon-Bonavita, M., Durand, L., Aube, J., Gayet, N., Sandulli, R., . . . Zeppilli, D. (2020). Microbial communities of the shallow-water hydrothermal vent near naples, italy, and chemosynthetic symbionts associated with a free-living marine nematode. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2023. doi:10.3389/fmicb.2020.02023
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. og Stryer, L. (2002). Complex carbohydrates are formed by linkage of monosaccharides. *Biochemistry* (bls. 463-468). New York: W. H. Freeman.
- Bowman, J. P. (2015). Cellulophaga. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. 1-14. doi:10.1002/9781118960608.gbm00300

- Carter, G. R. (1990). Pseudomonas, aeromonas, plesiomonas, and vibrio. Í J. R. Cole (ritstjóri), *Diagnostic procedure in veterinary bacteriology and mycology* (5. Útgáfa. bls. 77-86). San Diego: Academic Press. doi: 10.1016/B978-0-12-161775-2.50011-6
- Chapman, G. H. (1945). The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *Journal of Bacteriology*, 50(2), 201-203. Sótt af <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16560988>
- Chen, Y., Lee, C., Lin, Y., Yin, K., Ho, C. og Liu, T. (2015). Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics*, 16(18), S13. doi:10.1186/1471-2105-16-S18-S13
- Chimetto, L. A., Cleenwerck, I., Moreira, A. P. B., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P. og Thompson, F. L. (2011). *Vibrio variabilis* sp. nov. and *vibrio maritimus* sp. nov., isolated from palythoa caribaeorum. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61(Pt 12), 3009-3015. doi:10.1099/ijs.0.026997-0
- Feuda, R., Dohrmann, M., Pett, W., Philippe, H., Rota-Stabelli, O., Lartillot, N., . . . Pisani, D. (2017). Improved modeling of compositional heterogeneity supports sponges as sister to all other animals. *Current Biology*, 27(24), 3864-3870.e4. doi:10.1016/j.cub.2017.11.008
- Fu, X. T. og Kim, S. M. (2010). Agarase: Review of major sources, categories, purification method, enzyme characteristics and applications. *Marine Drugs*, 8(1), 200-218. doi:10.3390/md8010200
- Garcia-Dav, S., Munoz-Ocho, M., Rivas-Mora, C. og Viveros-Va, E. (2018). Biological activities from the marine sponge suberites aurantiacus. *Journal of Biological Sciences (Faisalabad, Pakistan)*, 18(3), 152-157. doi:10.3923/jbs.2018.152.157

- Geptner, A., Kristmannsdottir, H., Kristjansson, J. og Marteinsson, V. (2002). Biogenic saponite from an active submarine hot spring, Iceland. *Clays and Clay Minerals*, 50(2), 174-185. doi:10.1346/000986002760832775
- Hamana, K. og Nakagawa, Y. (2001). Polyamine distribution profiles in newly validated genera and species within the flavobacterium-flexibacter-cytophaga-sphingobacterium complex. *Microbios*, 106, 105-116. Sótt af <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11548199>
- Harrison, R. (2010). *Gásir hinterlands project 2009 midden prospection and excavation*. New York: FSÍ.
- Jahromi, S. og Barzkar, N. (2018). Future direction in marine bacterial agarases for industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(16), 6847-6863. doi:10.1007/s00253-018-9156-5
- Johansen, J. E., Nielsen, P. og Sjöholm, C. (1999). Description of cellulophaga baltica gen. nov., sp. nov. and cellulophaga fucicola gen. nov., sp. nov. and reclassification of [cytophaga] lytica to cellulophaga lytica gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49(3), 1231-1240. doi:10.1099/00207713-49-3-1231
- Johnson, E. A. og Schroeder, W. A. (2006). Microbial carotenoids. *Downstream Processing Biosurfactants Carotenoids*, , 119-178. doi:10.1007/BFb0102327
- Jung, B. og Hoilat, G. J. (2021). *MacConkey medium*. Treasure Island (FL): StatPerls Publishing. Sótt af https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/#_NBK557394_pubdet

- Kang, C., Shin, Y., Jang, S., Jung, Y. og So, J. (2016). Antimicrobial susceptibility of vibrio alginolyticus isolated from oyster in korea. *Environmental Science and Pollution Research International*, 23(20), 21106-21112. doi:10.1007/s11356-016-7426-2
- Kientz, B., Marié, P. og Rosenfeld, E. (2012). Effect of abiotic factors on the unique glitter-like iridescence of cellulophaga lytica. *FEMS Microbiology Letters*, 333(2), 101-108. doi:10.1111/j.1574-6968.2012.02614.x
- Kim, D., Jang, Y., Kim, K., Lee, M., Kim, A., Jo, E., . . . Lee, E. (2011). Isolation and culture properties of a thermophilic agarase-producing strain, microbulbifer sp. SD-1. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 14(3), 186-191. Sótt af http://click.ndsl.kr/servlet/LinkingDetailView?cn=JAKO201133549753230&dbt=JAKO&org_code=O481&site_code=SS1481&service_code=01
- Laughon, B. E., Syed, S. A., og Loesche, W. J. (1982). API ZYM system for identification of bacteroides spp., capnocytophaga spp., and spirochetes of oral origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 15(1), 97-102. doi:10.1128/JCM.15.1.97-102.1982
- Market research future. (2021). *Global carotenoids market research report : Information by product type (beta-carotene, lutein, lycopene, astaxanthin, zeaxanthin, canthaxanthin, and others), source (natural and synthetic), application (dietary supplements, food & beverages, personal care, pharmaceuticals, and others), and region (north america, europe, asia-pacific, and rest of the world)*. WantsStats Reserch and media Pvt. Ltd. Sótt af <https://www.marketresearchfuture.com/reports/carotenoids-market-1260>

- Moats, W. A. og Kinner, J. A. (1974). Factors affecting selectivity of brilliant green-phenol red agar for salmonellae. *Applied Microbiology*, 27(1), 118-123.
doi:10.1128/AEM.27.1.118-123.1974
- Mohamad, N. I., Adrian, T., Tan, W., Muhamad Yunos, N. Y., Tan, P., Yin, W. og Chan, K. (2016). *Vibrio variabilis* T01: A tropical marine bacterium exhibiting unique N-acyl homoserine lactone production. *Frontiers in Life Science*, 9(1), 17-23.
doi:10.1080/21553769.2015.1066716
- Murillo, A. G., Hu, S. og Fernandez, M. L. (2019). Zeaxanthin: Metabolism, properties, and antioxidant protection of eyes, heart, liver, and skin. *Antioxidants*, 8(9), 390.
doi:10.3390/antiox8090390
- Mustapha, S., Mustapha, E. M. og Cohen, N. (2013). *Vibrio alginolyticus*: An emerging pathogen of foodborne diseases. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 2(4), 302-309.
- Park, S. H., Lee, C. og Hong, S. (2020). Implications of agar and agarase in industrial applications of sustainable marine biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(7), 2815-2832. doi:10.1007/s00253-020-10412-6
- Percival, S. L. og Williams, D. W. (2014). Chapter twelve - vibrio. Í R. M. Chalmers og N. F. Gray (ritstjórar), *Microbiology of waterborne diseases* (2. Útgáfa, bls. 237-248). London: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-415846-7.00012-3
- Reimer, L. C., Sarda Carbasse, J., Koblitz, J., Podstawka, A. og Overmann, J. (2020). *Cellulophaga lytica* (lewin 1969) johansen et al. 1999 emend. hahnke et al. 2016.
doi:10.13145/bacdrive5499.20201210.5

- Schreier, J. E. og Lutz, R. A. (2019). Hydrothermal vent biota☆. Í J. K. Cochran, H. J. Bokuniewicz og P. L. Yager (ritstjórar), *Encyclopedia of ocean sciences (third edition)* (bls. 308-319). Oxford: Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-409548-9.11391-0
- Sajilata, M. G., Singhal, R. S. og Kamat, M. Y. (2008). The carotenoid pigment Zeaxanthin - A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 7(1), 29-49. doi:10.1111/j.1541-4337.2007.00028.x
- Selby, H. H. og Whistler, R. L. (1993). Chapter 5 - agar. *Industrial gums* (3. útgáfa, bls. 87-103). doi:10.1016/B978-0-08-092654-4.50009-7
- Silhavy, T. J., Kahne, D. og Walker, S. (2012). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(5), a000414. doi:10.1101/cshperspect.a000414
- Thacker, R. W., Díaz, M. C., Kerner, A., Vignes-Lebbe, R., Segerdell, E., Haendel, M. A. og Mungall, C. J. (2014). The porifera ontology (PORO): Enhancing sponge systematics with an anatomy ontology. *Journal of Biomedical Semantics*, 5(1), 39. doi:10.1186/2041-1480-5-39
- Torres, M. D., Flórez-Fernández, N. og Domínguez, H. (2019). Integral utilization of red seaweed for bioactive production. *Marine Drugs*, 17(6), 314. doi:10.3390/md17060314
- Umhverfisstofnun. (2003). Strýturnar í Eyjafirði. Sótt af https://ust.is/library/Skrar/Einstaklingar/Fridlyst-svaedi/Hverastrytur-Eyjafirdi/verndaraaetlun_stryturnar_eyjafirdi.pdf

Vacelet, J. og Duport, E. (2004a). Prey capture and digestion in the carnivorous sponge *asbestopluma hypogea* (porifera: Demospongiae). *Zoomorphology*, 123(4), 179-190. doi:10.1007/s00435-004-0100-0

Viggó Thór Marteinsson, Jakob K. Kristjánsson, Hrefna Kristmannsdóttir, Maria Dahlkvist, Kristján Sæmundsson, Mark Hannington, . . . Peter Stoffers. (2001). Discovery and description of giant submarine smectite cones on the seafloor in eyjafjordur, northern iceland, and a novel thermal microbial habitat. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 827-833. doi:10.1128/aem.67.2.827-833.2001

Yoshizawa, S., Wada, M., Yokota, A. og Kogure, K. (2010). *Vibrio sagamiensis* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from sea water. *Journal of General and Applied Microbiology*, 56(6), 499-507. doi:10.2323/jgam.56.499

Zeece, M. (2020). Food additives. *Introduction to the chemistry of food* (bls. 251-311) Academic Press. doi:10.1016/B978-0-12-809434-1.00007-4

Zimbro, M. J., Power, D. A., Miller, S. M., Wilson, G. E. og Johnson, J. A. (2009). *Difco & BBL manual of microbiological culture media*. (2. útgáfa). Sparks: Becton, Dickinson and Company.

Viðauki

Viðauki 1

Stofnar

Hér eru listaðir upp allir upphaflegu stofnarnir sem teknir voru úr frysti og sáð bæði á agarplötur og í broth.

Tafla 5 : Upprunalegu stofnarnir

Merking	númer
Svampur	Stofn
L 103	21
L104	1
L104	2
L104	3
L104	4
L104	5
L104	6
L105	1
L108	1
L108	5
L201	17
L201	18
L201	19
L201	20
L203	1
L203	2
L203	18
L203	19
L203	20
L203	21
L203	22
L203	23
L203	24
L205	1
L205	2
L205	31
L205	32
L205	33
L205	34
L206	52
L206	53
L206	56