



UiT

NORGES  
ARKTISKE  
UNIVERSITET

Norges fiskerihøgskole ved Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi,  
UiT Norges arktiske universitet

## **Mikrobiota hos grønn kråkebolle, *Strongylocentrotus droebachiensis***

*Fokus på identifikasjon av bakteriestammer*

—

**Solveig Bentsdal**

*Masteroppgave i marin bioteknologi (60 sp). Mai 2017.*





## Forord

Denne masteroppgaven i marin bioteknologi ble utført med forskningsgruppen Marin Bioprospektering på Norges fiskerihøgskole (NFH) ved Universitetet i Tromsø (UiT)– Norges arktiske universitet, året 2016 og våren 2017. Oppgaven var knyttet opp til det pågående doktorgradsprosjektet til Jonathan Hira, og hovedveileder på oppgaven var professor Klara Stensvåg.

Først og fremst ønsker jeg å rette en stor takk til hele forskningsgruppen, for blant annet gode ideer og råd både på laboratoriet og under oppgaveskrivingen. Spesielt ønsker jeg å takke Jonathan Hira og Klara Stensvåg for fantastisk veiledning og støtte gjennom hele oppgaveprosessen. I tillegg vil jeg takke fiskehelselaboratoriet ved Havbruksstasjonen i Tromsø AS for hjelp ved utføring av smitteforsøk, Medisinsk Genetisk avdeling på Universitetssykehuset Nord-Norge (UNN) for sekvensering av prøver, Elektronmikroskopisk avdeling på UiT for hjelp til mikroskopering av prøver, samt Brian Guenningsman ved Avdeling for Mikrobiologi og Smittevern på UNN for innføring og assistanse på MALDI-TOF MS.

Jeg vil også gi en stor takk til mine klassekamerater, venner og familie som har vist interesse for det jeg har drevet med, gitt meg motivasjon og energi, samt holdt ut med meg i tunge tider. Sist men ikke minst vil jeg takke min støttespiller, venn og kjæreste Toke Madsen, som har hjulpet meg gjennom studietiden.

Tromsø, Mai 2017





## Sammendrag

Det er rapportert at den grønne kråkebollen, *Strongylocentrotus droebachiensis*, kan rammes av symptomer som har gitt navn til sykdommen kalt «skallet kråkebollesyndrom». Imidlertid er ingen patogener for kråkeboller kjent i litteraturen, men det er dannet en arbeidshypotese om at arter tilhørende *Vibrio splendidus* klade kan assosieres med symptomer karakterisert som skallet kråkebollesyndrom hos arten *S. droebachiensis*.

Undersøkelser ved hjelp av 16S rRNA-sekvensering i denne oppgaven viser tilstedeværelse av arter tilhørende *V. splendidus* klade hos både friske og syke *S. droebachiensis*. Da gensekvensering viste seg å være en tidkrevende, kostbar og upålitelig metode for å identifisere *Vibrio*-bakterier på artsnivå, ble det utviklet en MALDI-TOF MS database for raskere og enklere identifisering av bestemte *Vibrio*-arter. I tillegg ble det utført nærmere analyse med helgenomsekvensering på noen av de *V. splendidus*-relaterte-isolatene isolert fra syke *S. droebachiensis*. Virulensfaktorer som OmpU, vsm, flagell og hemolytisk aktivitet ble funnet hos isolatene, men et eksperimentelt, lite smittforsøk kunne likevel ikke verifisere arbeidshypotesen. Ytterligere forsøk bør derfor utføres.



## Summary

It has been reported that the green sea urchin, *Strongylocentrotus droebachiensis*, can be affected by symptoms that is associated with the disease called “bald sea urchin disease”. However, no pathogen for sea urchins are known in the literature, but a working hypothesis claims that species of the *Vibrio splendidus* clade can be associated with symptoms characterized as bald sea urchin disease in *S. droebachiensis*.

With use of 16S rRNA sequencing, it is shown in this study that species belonging to the *V. splendidus* clade are present in both healthy and diseased *S. droebachiensis*. As gene sequencing proved to be a time consuming, costly and unreliable method for identifying *Vibrio* bacteria at species level, a MALDI-TOF MS database was developed for easier and faster identification of certain *Vibrio* species. In addition, further analysis was performed with whole genome sequencing on some of the *V. splendidus* related isolates from diseased *S. droebachiensis*. Virulence factors such as OmpU, vsm, flagellum and hemolytic activity were found in the isolates, but still a small challenge experiment could not verify the working hypothesis.





## Forkortelser

AMP – Antimikrobiell peptid

Bp – Base par

CF – Coelomvæske/Coelomic fluid

CFU – Colony forming units

DNA – Deoxyribonucleic Acid

FMAP – Fortynnet Marin Agar Pepton

MALDI-TOF - Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight

MS – Massespektrometri

m/z – Masse/ladnings ratio

OD – Optisk tetthet

OmpU – Outer membrane protein U

PBS – Fosfatbuffer med salt

PCR – Polymerase chain reaction

PM – Peristomal membrane

recA – Recombination Protein A

RNA – Ribonucleic Acid

TAE – Tris-Acetate-EDTA

TP/TL – Test part/Test lesion/Overflate

Vsm – Extracellular zinc metalloprotease



# Innhold

1	Innledning.....	1
1.1	Akvakultur og Kochs postulater .....	1
1.2	Kråkeboller .....	2
1.3	<i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> .....	4
1.4	Sykdom hos kråkeboller .....	5
1.5	Marine bakterier.....	7
1.6	Identifikasjon av dyrkbare marine bakterier .....	10
2	Bakgrunnen for denne oppgaven.....	15
3	Mål med oppgaven .....	17
4	Materialer og metoder .....	18
4.1	Kjemikalier og reagenser .....	18
4.2	Dyrkingsmedier og buffere .....	18
4.3	Primere benyttet for sekvensering av genetiske markører .....	19
4.4	Biologisk materiale .....	20
4.5	Eksperimentelt, innledende smitteforsøk.....	20
4.6	Prøvetakning av Kråkeboller .....	23
4.7	Isolering av dyrkbare bakterier fra råmateriale.....	24
4.8	Morfologisk undersøkelse av bakterieisolater .....	24
4.9	Sekvensering av 16S rRNA-genet til bakterieisolater .....	26
4.10	Sekvensering av RecA-genet til bakterieisolater .....	28
4.11	Helgenomanalyse av bakterieisolater .....	29
4.12	MALDI-TOF MS-analyse av bakterieisolater .....	29
5	Resultater.....	33
5.1	Identifisering av bakterieisolater fra friske <i>S. droebachiensis</i> .....	33
5.2	Eksperimentelt, innledende smitteforsøk på <i>S. droebachiensis</i> .....	35
5.3	Karakterisering og identifisering av bakterieisolater .....	41
6	Diskusjon.....	60
6.1	Mikrobiotaen hos <i>S. droebachiensis</i> .....	60
6.2	Patogene <i>Vibrio</i> -stammer og smitteforsøk.....	61
6.3	Metodikk for identifikasjon og karakterisering av <i>Vibrio</i> -stammer .....	64

7	Konklusjon .....	68
8	Litteraturliste .....	69
9	Appendiks 1.....	A

# 1 Innledning

Det mikrobielle livet eksisterer på alle områder og alle steder i vårt naturlige miljø. I det daglige liv lever vi som regel i harmoni med mikrobene, men noen mikroorganismer er patogene og kan forårsake problemer både for helsen vår og for våre oppdrettsprodukter. For eksempel antyder estimering av de økonomiske tapene i akvakulturen av fisk, at Japan mistet minst 16,4 millioner amerikanske dollar i 2004 alene på grunn av sykdomsfremkallende mikrober [1]. I akvakulturen av andre marine organismer, som for eksempel i oppdrettsnæringen av kråkeboller nord i Kina, har også sykdomsfremkallende mikroorganismer vært årsaken til store økonomiske tap [2]. Taksonomiske og fylogenetiske undersøkelser på marine mikrober er derfor svært viktig, da kunnskap om patogene agens kan løse noen utfordringer knyttet til sykdom i akvakulturen [3].

## 1.1 Akvakultur og Kochs postulater

Akvakulturen utgjør et stort bidrag til produksjonen av mat i mange deler av verden. I Norge kjenner vi godt til oppdrett av laks, som utgjør omtrent 1,3 millioner tonn matfisk i året til en førstehåndsverdi på ca. 44,3 milliarder kroner (2015) [4]. På grunn av akvakulturens omfang og betydning for kloden vår, må akvakulturen være bærekraftig både miljømessig og økonomisk. Det er dermed et stort fokus på sykdomsforebygging for å redusere tap, og i henhold til det miljømessige perspektivet med en redusert bruk av antibiotika. Vaksinasjon er derfor i dag den viktigste metoden for sykdomsforebygging i akvakulturen, og den er avgjørende for en videreutvikling av en bærekraftig næring [5].

For sykdomsforebygging i akvakulturen er det nødvendig å konstatere hvilke smitteagens som forårsaker sykdom hos aktuell oppdrettsorganisme. For å fastslå at en mikroorganisme er årsak til en gitt sykdom, må et sett av kriterier være oppfylt. Disse er navngitt Kochs postulater, og lyder som følger; (I) mikroorganismen skal kunne isoleres og fremstilles i renkultur i alle sykdomstilfeller, (II) mikroorganismen skal ikke forekomme ved andre sykdommer, (III) den isolerte mikroorganismen må være i stand til å fremkalle sykdommen hos forsøksdyr, og (IV) mikroorganismen må kunne re-isoleres fra forsøksdyrene [6]. Et av mange eksempler på en mikroorganisme som ved Kochs postulater er konstatert å være patogen for laks, er den Gram-positive bakterien *Rhodococcus erythropolis* [7].

Selv om oppdrett på laks utgjør en av de største næringene i akvakulturen, inkluderer likevel akvakulturen blant annet produksjon av flere fiskearter, krepsdyr, alger, skjell og kråkeboller. For eksempel var Troms Kråkebolle AS et firma i Norge som drev opprett på kråkeboller, med et landbasert klekkeri på Skitteneelv, Tromsø, og en sjøbasert avdeling i Kårvika, Tromsø [8]. I vesten generelt er oppdrett på kråkeboller er en relativt ny næring, slik at forskning på denne organismenes immunsystem er viktig for å øke kunnskap om organismen [9]. I henhold til litteraturen er det heller ikke definert noen patogene bakterier hos kråkeboller, slik at derfor, om det eksisterer et slik patogent agens, vil det være viktig å få avdekket og karakterisert det [9, 10].

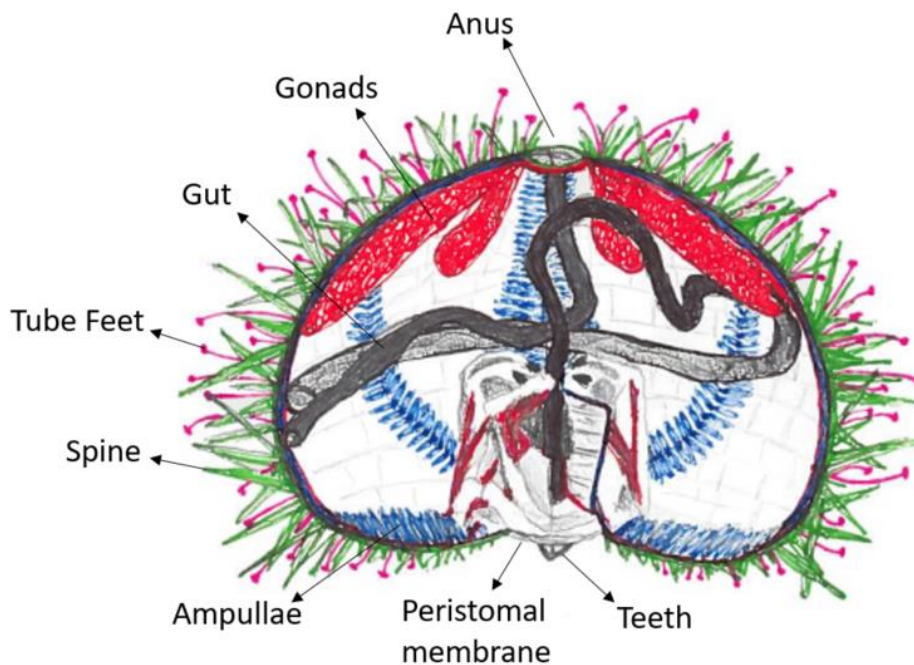
## 1.2 Kråkeboller

Kråkeboller er marine virvelløse dyr som tilhører klassen sjøpiggsvin (*Echinoidea*). De er allestedsnærværende organismer som finnes i alle verdenshavene og i de fleste marine habitat. Til tross for deres tilstedeværelse i nesten alle marine økosystem kan en finne de fleste kråkebolleartene i tempererte eller tropiske kystområder, mellom overflaten og ned til noen titalls meter dyp [11]. Dette fordi de i hovedsak lever av fotosyntetiserende alger, selv om de også kan livnære seg på andre virvelløse dyr som for eksempel blåskjell, børstemark, svamper og slangestjerner [12]. Vi mennesker har i relativt lang tid benyttet kråkeboller til mat, og i de siste tiårene har dyrkning av kråkeboller blitt en voksende industri. 16 kråkebollearter har til nå bidratt til den marine matproduksjonen, selv om det er registrert omtrent 1000 arter av kråkeboller i verden [13, 14].

### 1.2.1 Kråkebollens anatomi

Gonadene til kråkebollene, som ofte omtales som rogn, er det vi mennesker konsumerer. De kan se ut som små mandarinbåter som er lokalisert på innsiden av kråkebollens globulære kropp, mellom fem bånd av porer på det indre skjelettet/skallet. Båndene av porer strekker seg fra munnen på undersiden av kroppen til anus på oversiden av kroppen, og lager et stjerne-mønster på kråkebollens overflate. Ut i fra porene stikker det frem slanke, knappenålformede og utvidbare sugeføtter, som benyttes både som bevegelsesorgan og sanseorgan. I tillegg til sugeføtter er overflaten til kråkebollene dekket av sensoriske, bevegelige og beskyttende pigger, som hos noen arter kan inneholde gift. Rundt munnåpningen til kråkebollen er det ikke tilstedeværelse av pigger, men en myk membran kalt for peristomal membran (PM). Denne

membranen ligger rundt et komplekst tannsystem som kråkebollen benytter for konsum av mat eller til å grave seg gjemmesteder i koraller og steiner. Det som skiller kråkeboller i fra andre pigghuder er organismens store, interne hulrom kalt coelomic hulrom eller coelom. Dette hulrommet huser gonadene, fordøyelsessystemet, samt resten av kråkebollens organer, og er fylt med coelomvæske (coelomic fluid; CF). Coelomvæsken utgjør kråkebollens vaskulære system, og har mange av de samme funksjonene som blodet har hos pattedyr. Blant annet inneholder den ulike celletyper som både utgjør organismens immunologiske forsvarsmekanisme, samt brukes til transport av næringsstoffer og avfallsstoffer. I figur 1 illustreres den beskrevne anatomien til en kråkebolle. [9, 15, 16]

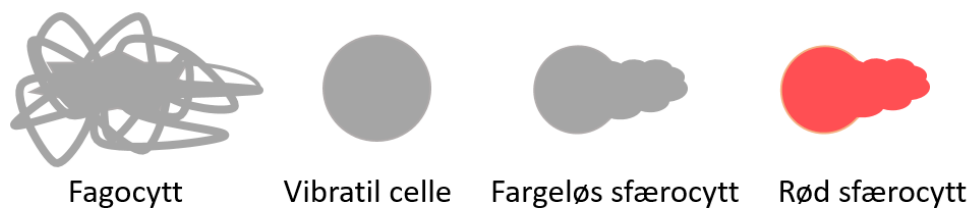


Figur 1: Illustrasjon av anatomien til en Kråkebolle. Skisse: Solveig Bentsdal

### 1.2.2 Kråkebollens forsvarssystem

I mange år ble det medfødte immunsystemet til echinoderms betraktet som en simpel form for immunsystem. I nyere undersøkelser på immunsystemet til organismen [17-20], samt ved publikasjonen av genomet til *Strongylocentrotus purpuratus* [21], har det derimot kommet frem at kråkeboller har et mer komplekst medfødt immunsystem enn tidligere antatt.

Coelomvæsken til kråkebollen utgjør organismens medfødte immunsystem, og består av blant annet coelomocytter (se figur 2). Disse kan sammenlignes med humane blodceller, og kan deles inn i fire subklasser: fagocytter, vibratile celler, fargeløse sfærocytter og røde sfærocytter [22-26]. I tillegg til coelomocytterne består immunsystemet til kråkebollen av flere immunreseptorer, en form for komplementsystem og mange antimikrobielle peptider (AMPs) [27]. Eksempel på AMPs isolert av Li et al. hos den grønne kråkebollen, *S. droebachiensis*, er strongylocins og centrocin [28, 29].



Figur 2: Illustrasjon over coelomocytterne til kråkeboller.

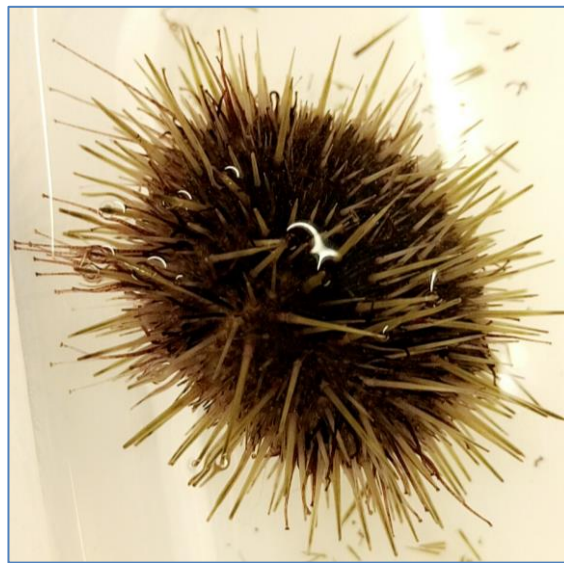
### 1.3 *Strongylocentrotus droebachiensis*

Langs norskekysten er *S. droebachiensis*, også kalt grønn kråkebolle eller Drøbakkråkebolle, en av de vanligste kråkebolleartene (figur 3) [30]. Denne arten er den mest utbredte arten i familien *Strongylocentrotidae* [31], og den finnes på den nordlige halvkule i områder med kaldt vann [32, 33]. Den lever på alle slags typer underlag fra 0 til 300 meters dybde, men trives best på steingrunn fra 0 til 50 meters dybde [32]. *S. droebachiensis* har evnen til å justere sin metabolisme og sitt aktivitetsnivå etter sesongmessige variasjoner i havtemperaturen, som kan variere fra -1 til 20 °C i løpet av et år [34]. Arten er ikke i stand til å vokse eller utvikle seg normalt om temperaturen overstiger 10 °C [35].

Tilgangen på næring er også en viktig faktor i forbindelse med vekst hos den grønne kråkebollen. Dette begrunnes med at bestander som er funnet på næringsfattige områder hovedsakelig består av små individer med høy dødelighet, mens bestander som er funnet på næringsrike områder består av større individer [36-38]. Det er dermed vanskelig å fastslå alderen til en grønn kråkebolle på bakgrunn av kroppsstørrelsen. I likhet med andre kråkebollearter er også den grønne kråkebollen en alteter, med matpreferanser som påvirkes sterkt av miljøfaktorer som temperatur, bunntopografi, bølger, konkurranse og predasjon [33, 39].



Imidlertid er det rapportert at familien *Strongylocentrotidae* foretrekker store, dominerende algearter som for eksempel *Saccharina longicruris* og *Laminaria digitata* [40], og på bakgrunn av dette har *S. droebachiensis* en viktig økologisk rolle i forhold til distribusjonen og mengden av makroalger i et marint miljø. I Norge har arten i lang tid blitt betraktet som en pest, særlig i områder hvor taren har vært viktig for andre kommersielle arter, og det er ikke før i nyere tid at kråkebollen har blitt ansett som en verdifull handelsvare [41]. Det bedrives derfor i dag oppdrett på kråkebollen flere steder i Norge, men bare i småskala [42].



Figur 3: Fotografi av *S. droebachiensis*, grønn kråkebolle, i sjøvann. Foto: Solveig Bental

#### 1.4 Sykdom hos kråkeboller

Siden begynnelsen av 20-tallet har det blitt rapportert om forskjellige typer sykdom hos flere ulike kråkebollearter. Blant annet har det blitt rapportert om noen store utbrudd som har ført til massedød av for eksempel *Diadema antillarum* i Det karibiske hav i 1983 og 1984 [43, 44], samt *S. droebachiensis* i Nova Scotia mellom 1980 og 1983 [45], med tilbakevendende utbrudd i 1993 og 1995 [46]. I tillegg har det blitt rapportert om flere mindre sykdomsutbrudd hos kråkeboller rundt om i alle verdenshavene [10].

Hva som forårsaker sykdom hos kråkebollene er i mange tilfeller uklart. Dette fordi det i flere tidligere studier ikke er avklart sykdomsfremkallende agens eller egenskaper til mistenkte agens, samt at symptomene til kråkebollene er dårlig beskrevet [10]. Imidlertid har både

bakterier, sopp, parasitter og til og med alger blitt vurdert og ansett som patogener [47]. For eksempel er det flere rapporter som bekrefter parasittangrep som har ført til alvorlige skader på kråkebollen *S. droebachiensis* [41]. Likevel er bakterier antatt å være den viktigste årsaken til sykdom i de fleste rapporterte tilfellene av kråkebollesykdom. Eksempel på bakterier som er isolert og studert i forbindelse med kråkebollesykdom er *Vibrio* [48, 49], *Flavobacterium* [50], *Pseudomonas* [50], *Aeromonas* [48], *Acinetobacter* [51], *Alcaligenes* [51] og *Pseudoalteromonas* [52].

#### 1.4.1 Skallet kråkebollesyndrom

Den mest rapporterte kråkebollesykdommen på begge sider av Nord-Atlanteren, samt i det nordøstlige Stillehavet, er sykdommen kalt for «skallet kråkebollesyndrom» (bald sea urchin disease). Syndromet ble først oppdaget i California i 1970 [50], og har siden 1978 blitt registrert i Middelhavet [53]. Den forekommer i flere ulike arter, der i blant *S. droebachiensis*, og den har fått navnet sitt etter ett av symptomene. Dette symptomet er skallethet, som vil si tap av pigger og sugeføtter på deler av kroppsoverflaten. I tillegg til skallethet oppstår det karakteristiske lesjoner av et mørkt, glinsende vev/belegg på skadeområdet (se figur 4). Innenfor dette beltet av svullent, mørkt vev kan en finne det indre skjelettet helt blottlagt eller eventuelt dekket av et grønnfarget, nevrotisk epidermalvev [10]. Lesjonene kan med tiden forsvinne eller de kan resultere i perforering av det indre skjelettet. Med andre ord kan sykdommen være dødelig, og det er blitt rapportert om massedød av kråkebolleartene *S. franciscanus* i California og *S. droebachiensis* i Nova Scotia på grunn av skallet kråkebollesyndrom [54, 55].

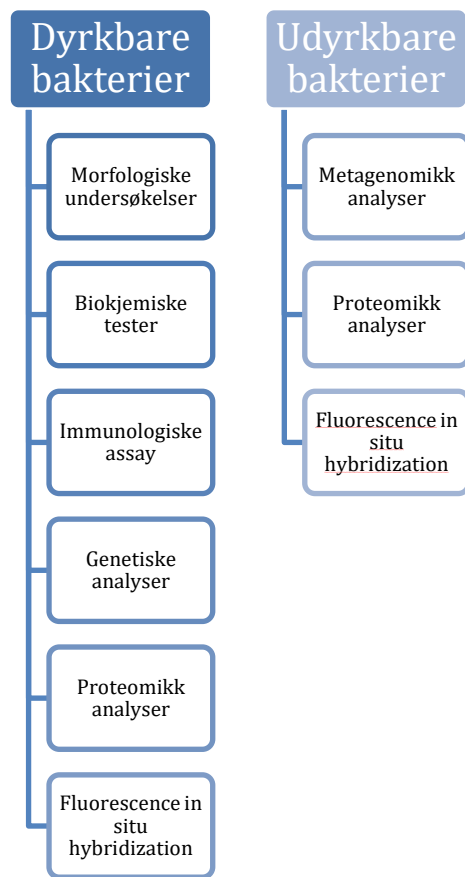


Figur 4: Fotografi av tre ulike grønne kråkeboller med skallet kråkebollesyndrom. Alle tre kråkebollene har dannelse av en mørk, rødlig lesjon på overflaten, i tillegg til tap av pigger og sugeføtter i området med lesjondannelse. Foto: Jonathan Hira

Årsaken til skallet kråkebollesyndrom er per i dag uklar, men sykdommen er i flere studier antatt å være forårsaket av bakterier. Dette påstås selv om det i mange av tilfellene ikke er blitt identifisert noen spesifikk patogen bakterie [10]. Likevel bør det nevnes at Gilles og Pearse i 1986 isolerte bakterier fra lesjoner på syke *S. purpuratus*, og konkluderte med at isolatene *Vibrio anguillarum* og *Aeromonas salmonicida* kunne være årsak til lesjondannelse [48]. I tillegg identifiserte Roberts-Regan et al. i 1988 85 bakterieisolater fra *S. droebachiensis* med og uten lesjon, og konkluderte med at det totale antallet mikroorganismer, samt antallet av bakteriene *Acinetobacter* og *Alcaligenes* var signifikant høyere på kroppsoverflaten til kråkebollene med lesjon (syk) enn på kråkebollene uten lesjon (frisk) [51]. Imidlertid ble bakteriene ved begge studiene identifisert basert på morfologiske undersøkelser og biokjemiske tester, som for eksempel Analytical Profile Index (API) tester.

## 1.5 Marine bakterier

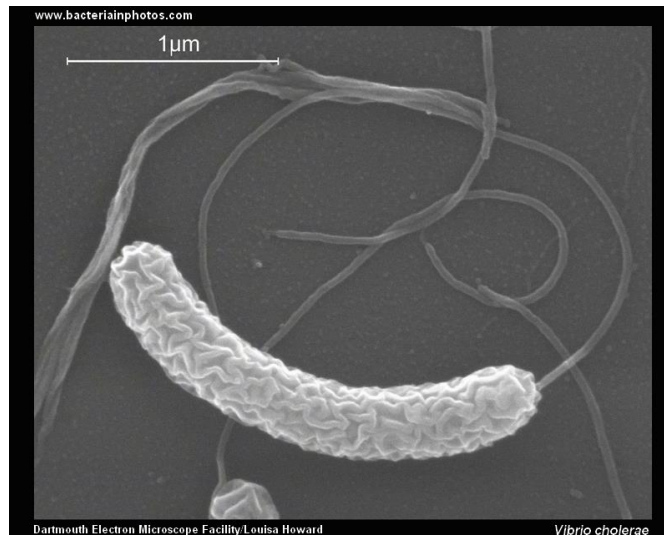
Marine bakterier kan en finne i alle marine habitater. Blant annet kan en finne de fritt suspendert i vannet, på små og store partikler, i sedimenter, samt på overflaten eller inne i kroppen og cellene til andre organismer [56]. Når det er sagt er det kun et fåtall (<1%) av de marine bakteriene som kan dyrkes frem og visuelt studeres [57]. Trolig er derfor ikke det største mangfoldet av marine bakterier per i dag identifisert og studert. Likevel er det utviklet flere metoder for å identifisere udyrkbare bakterier [57]. I figur 5 illustreres noen eksempler på metoder benyttet for å identifisere dyrkbare og udyrkbare bakterier.



Figur 5: Eksempler på ulike tilnærminger for identifikasjon av dyrkbare og udyrkbare bakterier.

### 1.5.1 *Vibrio splendidus* klade

Familien *Vibrionaceae* innenfor klassen  $\gamma$ -*proteobacteria* inkluderer de marine bakterieslektene *Aliivibrio*, *Echinimonas*, *Enterovibrio*, *Grimontia*, *Photobacterium*, *Salinivibrio* og *Vibrio* [58]. Bakteriene i denne familien er Gram-negative bakterier, som for det meste fremstår som stavformede, buede celler med en eneste flagell (se figur 6) [59], samt med hvitaktig, runde, små eller middels store kolonier. *Vibrio* er den største slekten, da den består av mer enn 90 arter fordelt over flere klader [58, 60]. Enkelte av disse artene er humanpatogene bakterier, og flere av artene er kjent for å være sykdomsfremkallende for ulike marine dyr [59]. Blant annet er *V. splendidus* klade en gruppe av nært beslektede arter som kan være patogen for ulike marine organismer, som for eksempel østers, sjøpølse, blekksprut og fisk [61-64].



Figur 6: SEM-bilde av *V. cholerae*. Bakterien har en buet, stavformet celle med en fluktuerende overflate og eneste flagell. Foto: Louisa Howard

*V. splendidus* klade omfatter 17 nært beslektede bakteriearter [65], og disse er listet opp i tabell 1. Artene er allestedsnærværende i akvatiske økosystemer, inkludert brakkvannsområder, åpne kystfarvann, i sedimenter og i akvakulturnæringen over hele verden [66]. I tillegg er de funnet i stor tetthet på overflaten eller i tarmfloraen hos marine dyr [67].

Flere av medlemmene i *V. splendidus* klade har hemolytisk aktivitet, som betyr at de enten produserer et toksin som lyses blodceller eller hydrogenperoksid som omdanner hemoglobin til methemoglobin. I tillegg har flere relativt lik 16S rRNA-gensekvens, i kombinasjon med høy sekvenslikhet av andre genetiske markører. Det har dermed vist seg å være vanskelig å identifisere og klassifisere de ulike artene i gruppen fra hverandre [68].

Tabell 1: De 17 bakterieartene i *V. splendidus* kladen. Navn på art, samt referanse på hvem som oppdaget arten er listet opp i tabellen.

<b>Bakterieart</b>	<b>Referanse:</b>
<i>Vibrio artabrorum</i>	Dieguez et al. (2011) [69]
<i>Vibrio atlanticus</i>	Dieguez et al. (2011) [69]
<i>Vibrio celticus</i>	Beaz-Hidalgo et al. (2010) [70]
<i>Vibrio chagasii</i>	Thompson et al. (2003) [71]
<i>Vibrio crassostreae</i>	Faury et al. (2004) [61]
<i>Vibrio cyclitrophicus</i>	Hedlund et al. (2001) [72]
<i>Vibrio fortis</i>	Thompson et al. (2003) [73]
<i>Vibrio gallaecicus</i>	Beaz-Hidalgo et al. (2009) [74]
<i>Vibrio gigantis</i>	Le Roux et al. (2005) [75]
<i>Vibrio hemicentroti</i>	Kim et al. (2013) [76]
<i>Vibrio kanaloae</i>	Thompson et al. (2003) [71]
<i>Vibrio lentus</i>	Macián et al. (2001) [77]
<i>Vibrio pelagius</i>	Ruimy et al. (1994) [78]
<i>Vibrio pomeroyi</i>	Thompson et al. (2003) [71]
<i>Vibrio splendidus</i>	Baumann et al. (1980) [79]
<i>Vibrio tasmaniensis</i>	Thompson et al. (2003) [80]
<i>Vibrio toranzoniae</i>	Lasa et al. (2013) [81]

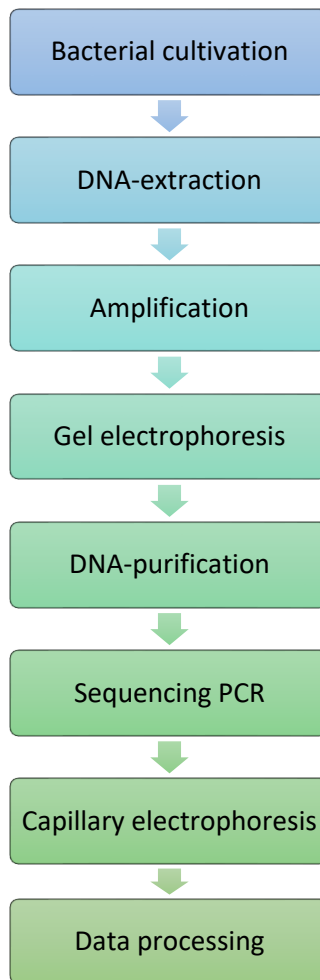
## 1.6 Identifikasjon av dyrkbare marine bakterier

Karakterisering, gruppering og identifisering av dyrkbare mikrobielle arter var opprinnelig basert på morfologisk karakterisering av kolonier og celler, samt biokjemiske tester som hemolytisk aktivitet. Dette både på grunn av den teknologiske begrensningen før i tiden og påvirkning av andre biologiske fagfelt, som for eksempel botanikk [82]. I dag er også slike fenotypiske undersøkelser en viktig tilnærming for karakterisering og identifisering av dyrkbare bakterier, men som regel i kombinasjon med genetiske og/eller proteomikk analyser [83]. Særlig genetiske analyser av enkelte genetiske markører, som for eksempel 16S rRNA-markøren, er mye benyttet. Denne metoden er etter hvert blitt å anse som en tradisjonell metode for identifisering av bakterier [84].

### 1.6.1 Genetiske markører for identifisering av bakterier

16S rRNA-genet koder for en komponent på den lille ribosomale subenhet til bakterier, og DNA-sekvensering av dette husholdningsgenet er i dag en av de vanligste metodene for å studere bakteriell fylogeni og taksonomi. Dette på grunn av en rekke årsaker, som inkluderer (I) 16S rRNA-genet er tilstedeværende i nesten alle bakterier; (II) funksjonen til den genetiske markøren har ikke endret seg over tid; og (III) 16S rRNA-genet (ca. 1500 bp) er stort nok for bioinformatiske analyser [85]. Carl Woese var en av de første som analyserte og kartla 16S rRNA-genet hos ulike bakterier ved hjelp av DNA-sekvensering i 1977, som den gang var en toppmoderne teknologi [86]. I den senere tid har det vært en eksplosjon i antall anerkjente taksa, og dette er direkte knyttet til hyppig bruk av 16S rRNA-sekvensering i taksonomiske studier [85, 87-89].

Ved utførelse av 16S rRNA-sekvensering begynner en med å ekstrahere DNAet til bakterien, før en amplifiserer 16S rRNA-gensekvensen med benyttelse av spesifikke primere, DNA-polymerase, nukleotider (dNTP) og et PCR-instrument (se figur 7) [65]. Deretter utfører en ofte en gelelektroforese på PCR-produktet, slik at en raskt kan sjekke at en har fått oppkopierte gensekvensen. Om resultatet av gelelektroforesen tilsier at en har fått amplifisert 16S rRNA-sekvensen til bakterien, er neste steg i prosessen rensing av PCR-produktet [90]. Videre utføres en ny PCR, før 16S rRNA-gensekvensen bestemmes ved hjelp av kapillærelektroforese. Til slutt databehandles den bestemte gensekvensen, og en får et resultat som kan benyttes til identifisering og fylogenetiske studier av bakterien [65].



Figur 7: Forløpet for DNA-sekvensering av genetiske markører, som f. eks. 16S rRNA-genet.

Selv om sekvensering av den genetiske markøren 16S rRNA er den vanligste tilnærmingen for identifikasjon og fylogenetisk studie av en bakterie, benyttes også andre genetiske markører til samme formål. Ofte sekvenseres en eller flere andre genetiske markører i tillegg til 16S rRNA-genet, da sekvensering av 16S rRNA-genet hos noen bakterier kan gi begrensninger i forhold til identifikasjon, karakterisering og gruppering [91-95]. Eksempel på andre genetiske markører er *ftsZ*, *gapA*, *gyrB*, *mreB*, *pyrH*, *rpoA*, *topA* og *recA* [96]. *recA* har blitt foreslått som en potensiell genetisk markør for å oppklare fylogenetiske relasjoner mellom høyere taksonomiske grader, slik som familier, klasser og rekke, på bakgrunn av sin funksjon som et husholdningsgen og sin tilstedeværelse i alle bakterier [97-99]. Proteinene *recA* er et multifunksjonelt protein som blant annet bidrar til homolog rekombinasjon og DNA-reparasjon [100]. Sekvensering av *recA*-genet utføres på samme måte som 16S rRNA-sekvensering, slik som vist i figur 7, men da med bruk av andre primere.



### 1.6.2 Helgenomanalyse for identifisering av bakterier

DNA-sekvensering av genetiske markører er et sentralt verktøy innenfor mange fagfelt, og tilnærmingen benyttes av blant annet mikrobiologiske taksonomer over hele verden. Like fullt har denne teknikken sin begrensning i forhold til å gi informasjon om alle gener i genomet til en organisme. I dag er det mulig å utføre helgenomanalyser, også kalt helgenomsekvensering, siden teknikkene og maskinene en benytter for å sekvensere DNA har blitt betydelig forbedret i løpet av de siste årene. Helgenomanalyse defineres som sekvensering av det komplette genomet til en organisme, og den første organismen som fikk sitt fullstendige genom sekvensert var bakterien *Haemophilus influenzae* i 1995 [101, 102].

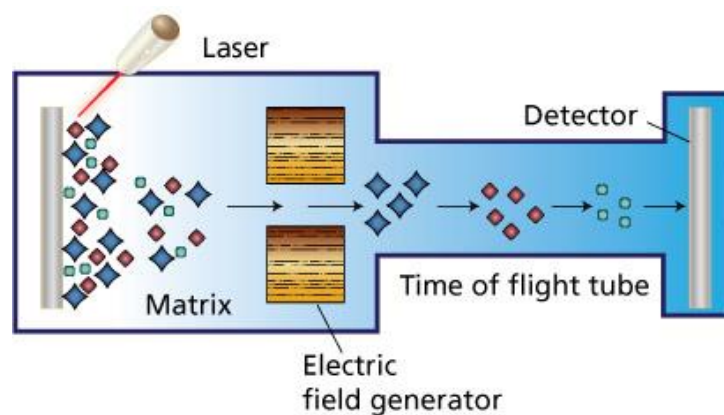
Ankomsten av helgenomanalyser har ført til at mikrobiell taksonomi nå i større grad baserer seg på den evolusjonære informasjonen i hele genomet til en bakterie. Særlig benyttes helgenomanalyser for identifisering og klassifisering av lavere taksonomiske grader som arter og stammer, når dette ikke lar seg gjøre med den klassiske fenotypiske karakteriseringen eller ved sekvensering av genetiske markører [103-105]. Imidlertid er helgenomanalyser per dags dato fortsatt relativt kostbar og tidkrevende [106]. I tillegg er ikke alle laboratorier i besittelse av teknologien som behøves, og må derfor sende prøvene sine til andre laboratorier for analysering. Andre, mindre kostbare og tidkrevende metoder for identifisering og klassifisering av bakteriearter og stammer er derfor å foretrekke, og i klinikken i dag benytter mange mikrobiologiske laboratorier matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) for identifisering av bakterier [107, 108].

### 1.6.3 MALDI-TOF MS for identifisering av bakterier

De første som benyttet massespektrometri til bakteriell identifisering var Anhalt og Fenselau i 1975 [109]. Etter den tid har matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) blitt en viktig teknikk for deteksjon, identifisering og karakterisering av mikroorganismer, og da spesielt av humanpatogene bakterier [109-112]. Metoden kan sammenliknes med sekvensering av genetiske markører, men har også den ekstra fordel av å generere unike biokjemiske fingeravtrykk/spekter for subtyper av arter. Prinsippet for metoden baserer seg på undersøkelse av proteiner, hovedsakelig ribosomale proteiner, ved hjelp av massespektrometri (se figur 8) [106].

Ved utførelse av MALDI-TOF MS blandes prøven (mikroorganismen eller proteinekstrakt av mikroorganismen) med en matrix på en testplate, og dette bombarderes med en laser. Matrixen

absorberer energi fra laseren, og dette fører til ionisering og frigjøring av matrix/prøvekrystaller (se figur 8). Et elektrisk felt flytter de ioniserte proteinene gjennom en «flight tube». Proteiner med ulik masse vil nå detektoren med ulik tid, slik at ved å måle tiden det tar fra laserpulsering til detektorsignal kan massen til proteinene beregnes. Dette visualiseres som masse over intensitet i et spesifikt spekter/fingeravtrykk. Spekteret for prøven sammenlignes mot referansespekter i en database, og et dataprogram angir en identitet for prøven. Sannsynligheten for riktig identifikasjon angis med en score, som sier noe om hvor godt prøven har identitet samsvarende med spekter i databasen [106].



Figur 8: Illustrasjon av prinsippet for MALDI-TOF MS. Figur: Sigma Aldrich

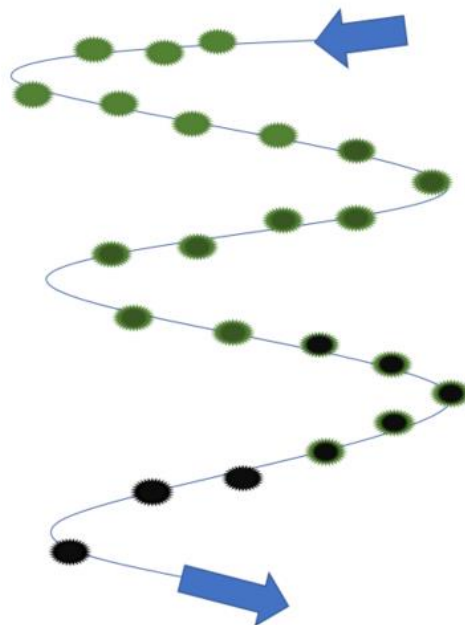
Fordi MALDI-TOF MS er et automatisk, enkelt og hurtig identifikasjonssystem som er lite kostbar i drift, har metoden i økende grad erstattet DNA-baserte analyser for pålitelig identifisering av bakterier [106]. Spesielt har metoden gjort et stort inntog i diagnostiske laboratorier, hvor de karakteriserer og identifiserer humanpatogene bakterier og andre humane bakterier som er isolert/fremdyrket fra humant materiale [108]. Derimot er det få rapporter om bruk av MALDI-TOF MS for identifikasjon av marine bakterier [113, 114]. Dette blant annet fordi de kommersielle databasene per i dag ikke er optimal for analyse av marine bakterier, da de ikke inneholder spekter i fra alle registrerte marine bakterier [115].

## 2 Bakgrunnen for denne oppgaven

Forskningsgruppen Marin Bioprospektering ved NFH har i en rekke prosjekter fokusert på antimikrobielle forbindelser, slik som antibakterielle peptider (AMP), hos marine invertebrater og andre marine organismer. Blant annet er det fokusert på at disse er forsvarsmolekyler som er viktige i vert-mikrobe-interaksjoner. Eksempel er to hovedfamilier av AMPer fra *S. droebachiensis* isolert og karakterisert ved forskningsgruppen [28].

Samtidig med denne oppgaven pågår det et doktorgradsprosjekt i forskningsgruppen på mikrobiotaen hos *S. droebachiensis*, der hensikten er å indikere patogener for arten *S. droebachiensis*, samt studere interaksjonen mellom celler hos *S. droebachiensis* og eventuelle patogener. Da dette doktorgradsprosjektet ble inngått, hadde forskningsgruppen et samarbeid med et oppdrettsfirma på kråkeboller. Firmaet hadde på det tidspunktet en uønsket høy dødelighet i anlegget. I tillegg hadde flere kråkeboller symptomer, som for eksempel tap av pigger og en mørk overflate med et glinsende, flekkvis belegg. Noen ganger så det ut som at de affiserte kråkebollene kom seg og de mørke flekkene ble mindre, mens andre ganger døde kråkebollene. Med andre ord kunne symptomene ligne på «skallet kråkebollesyndrom» som en kjenner fra litteraturen [10, 48, 50]. Imidlertid visste en ikke om det kunne være hygieniske årsaker, uheldig konstruksjon av anlegg (se figur 9), smitteagens eller en kombinasjon av flere årsaker som forårsaket høy dødelighet og symptomer hos kråkebollene. En visste heller ikke om symptomene var tegn på primære eller sekundære effekter. Forskningsgruppen valgte likevel å avgrense fokuset til mulig smitteagens. I første omgang ble det dermed tatt mikrobiologiske prøver, og fokuset ble videre avgrenset til dyrkbare bakterier [Stensvåg, Li, pers. komm].

Ved starten av det pågående doktorgradsprosjekt, ble både affiserte og friske *S. droebachiensis* fra oppdrettsfirmaet benyttet. Det ble tatt bakterieprøver fra lesjonene/overflaten, coelomvæsken og peristomal membran til kråkebollene, og deretter foretatt videre analyse av koloniene som vokste opp. Særlig de bakteriene som vokste opp fra affiserte kråkeboller ble ansett som interessante. Disse bakterieisolatene ble identifisert og karakterisert ved hjelp av morfologiske undersøkelser, 16S rRNA-sekvensering og påvisning av virulensgenet Outer membrane protein U (OmpU) [Hira, pers. komm].



Figur 9: Skisse for vannstrøm og oppbygning av anlegg for kråkebolleoppdrett. Kråkebollene var lokalisert i oppdrettsrenner, med en vanntilførsel som starter i en del av anlegget og fortsatte til andre deler av anlegget (blå pil). En kunne se at flere kråkeboller i nedre del av anlegget tilsynelatende var mer affisert enn kråkebollene i øvre del (her illustrert med en økende grad av mørkere farge).

Resultatene tilsa at de affiserte kråkebollene hadde tilstedeværelse av et høyt antall bakterier som tilhørte *Vibrio splendidus* klade. Dette ga dermed en indikasjon på at bakterieisolater tilhørende *Vibrio splendidus* klade, er mulige patogener for arten *S. droebachiensis*. Særlig to isolater fra de syke, grønne kråkebollene var interessante, da disse var hemolytiske og ga utslag for virulensgenet OmpU. Disse to bakterieisolatene ble navngitt *Vibrio sp. TL006* og *Vibrio sp. CF002*. Andre bakterieisolater tilhørende *Vibrio sp.* som ble isolert fra kråkebollene var *Vibrio sp. TL002*, *-TL003* og *-CF001* [Hira, pers. komm].

En arbeidshypotese ble dannet på bakgrunn av disse resultatene og denne lyder som følger:

Bakteriearter innenfor *Vibrio splendidus* klade kan assosieres med symptomer som karakteriseres som skallet kråkebollesyndrom hos arten *S. droebachiensis*.

### 3 Mål med oppgaven

#### Hovedmål

- ❖ Studere mikrobiotaen hos friske og syke kråkeboller, *S. droebachiensis*, med et avgrenset fokus på dyrkbare *Vibrio*-bakterier

For å teste arbeidshypotesen om at arter tilhørende *V. splendidus* klade kan assosieres med symptomer karakterisert som skallet kråkebollesyndrom hos arten *S. droebachiensis*, ble følgende **delmål** definert for prosjektet:

- ❖ Utføre et lite, eksperimentelt smitteforsøk med *Vibrio*-bakterier isolert fra «syke» kråkeboller
- ❖ Artsbestemme *Vibrio*-bakterier isolert fra syke kråkeboller
- ❖ Utvikle en MALDI-TOF MS database for *Vibrio*-bakterier isolert fra syke kråkeboller
- ❖ Identifisere virulensgener hos *Vibrio*-bakterier isolert fra syke kråkeboller ved hjelp av helgenomsekvensdata
- ❖ Sammenligne metoder for identifikasjon av arter tilhørende *V. splendidus* klade

## 4 Materialer og metoder

### 4.1 Kjemikalier og reagenser

Kjemikalier og reagenser som ble benyttet ved denne oppgaven er beskrevet i tabell 2.

Tabell 2: Oversikt over kjemikalier og reagenser benyttet ved denne oppgaven, samt produsenten til gitt kjemikalium/reagens.

<b>Kjemikalium/reagens:</b>	<b>Produsent:</b>
Acetonitrile, $\geq 99.8\%$	Sigma-Aldrich Inc., Steinheim, Tyskland
Acetic acid, 99,5%	Sigma-Aldrich Inc.
Agarose	Sigma-Aldrich Inc.
Bacteriological Peptone	Sigma-Aldrich Inc.
EDTA disodium salt dihydrate, 99-100%	Sigma-Aldrich Inc.
Ethanol, 96%	Sigma-Aldrich Inc.
Ethidium bromide solution, 1% in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Inc.
Formic Acid, $\geq 98\%$	Sigma-Aldrich Inc.
Glutaraldehyde solution, 25% in H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Inc.
Glycerol solution, 86-89%	Sigma-Aldrich Inc.
Marine Broth	Difco™, Becton Dickinson and Company, Sparks, USA
NaCl	Sigma-Aldrich Inc.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 12 H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich Inc.
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich Inc.
Osmium tetroxide	Sigma-Aldrich Inc.
Poly-L-lysine solution	Sigma-Aldrich Inc.
Trizma base	Sigma-Aldrich Inc.
Ultra-Pure Water	Biochrom GmbH, Berlin, Tyskland

### 4.2 Dyrkingsmedier og buffere

Bakterielle dyrkingsmedier som ble benyttet for oppdyrking av marine bakterier ved denne oppgaven var Fortynnet-Marin-Agar-Pepton (FMAP) agar, -broth og -blod agar [Landfald, pers. komm]. Oppskriften for tillaging av disse mediene, i tillegg til bufferne som ble benyttet i denne oppgaven, er beskrevet i tabell 3.

Tabell 3: Oversikt over innholdet i de ulike mediene og bufferne som ble benyttet i denne oppgaven. Produsent av kjemikaliene som ble benyttet er oppgitt i tabell 2.

Navn på medium/buffer:	Innhold i medium/buffer:
FMAP agar	0,15% Marine Broth, 0,05% Bacteriological Peptone, 0,15% Agarose, 3% sterilt sjøvann.
FMAP broth	0,15% Marine Broth, 0,05% Bacteriological Peptone, 3% sterilt sjøvann.
FMAP blod agar	0,15% Marine Broth, 0,05% Bacteriological Peptone, 0,15% Agarose, 5% Sheep Blod, 3% sterilt sjøvann.
Fosfatbuffer med salt (PBS)	0,22% NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> * 12 H <sub>2</sub> O, 0,06% NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,90% NaCl.
Tris-Acetate-EDTA (TAE) buffer	0,48% Trizma base, 0,11% Acetic acid 0,20% EDTA

#### 4.3 Primere benyttet for sekvensering av genetiske markører

Primerne som ved denne oppgaven ble benyttet for sekvensering av genetiske markører er alle produsert av Sigma-Aldrich Inc. En oversikt over primerne, samt deres gitte primersekvens er vist i tabell 4.

Tabell 4: Oversikt over primere som ble benyttet for sekvensering av genetiske markører ved denne oppgaven, samt deres gitte primersekvens.

Navn på primer:	Primersekvens:
16S rRNA-B27-Forward	«AGAGTTTGATCCTGGCTCAG»
16S rRNA-U1492-Revers	«GGTACCTTGTTACGACTT»
recA-01-Forward	«TGARAARCARTTYGGTAAAGG»
recA-02-Revers	«TCRCCNTTRTAGCTRTACC»

## 4.4 Biologisk materiale

### 4.4.1 Kråkeboller

Ved denne oppgaven ble det isolert og identifisert dyrkbare marine bakterier fra 12 stk. friske *Strongylocentrotus droebachiensis*, som var oppsamlet utenfor Tromsø i slutten av februar 2016 og lagret i tank ved NFH. De 12 kråkebollene hadde ikke synlig dannelse av lesjon på kroppsoverflaten, var 4-5 cm. i diameter og veide ca. 40-50g.

I tillegg ble det ved denne oppgaven benyttet 72 stk. *S. droebachiensis* til et eksperimentelt smitteforsøk. Disse kråkebollene ble oppsamlet i begynnelsen av mai 2016 av Jonathan Hira (UiT), Hege Devold (UiT) og dykker Phillip James (Nofima), like utenfor Havbruksstasjonen i Tromsø AS lokalisert i Kårvika. Kråkebollene hadde ikke synlig lesjondannelse på overflaten, var 4-5 cm. i diameter og veide ca. 40-50g.

### 4.4.2 Bakterier

Bakterieisolatene *Vibrio sp.* TL002, -TL003, -TL006, -CF001 og -CF002, isolert ved den overnevnte doktorgradstudien, ble benyttet ved denne oppgaven. Bakterienavn med bokstavene TL betyr at bakterieisolatet var isolert fra lesjon, mens bakterienavn med bokstavene CF betyr at isolatet var isolert fra coelomvæsken.

*Vibrio anguillarum* LFI 317 [116], isolert fra atlantisk laks av Norsk Veterinærinstitutt (NVI), ble benyttet som kontroll ved analysering på MALDI-TOF MS.

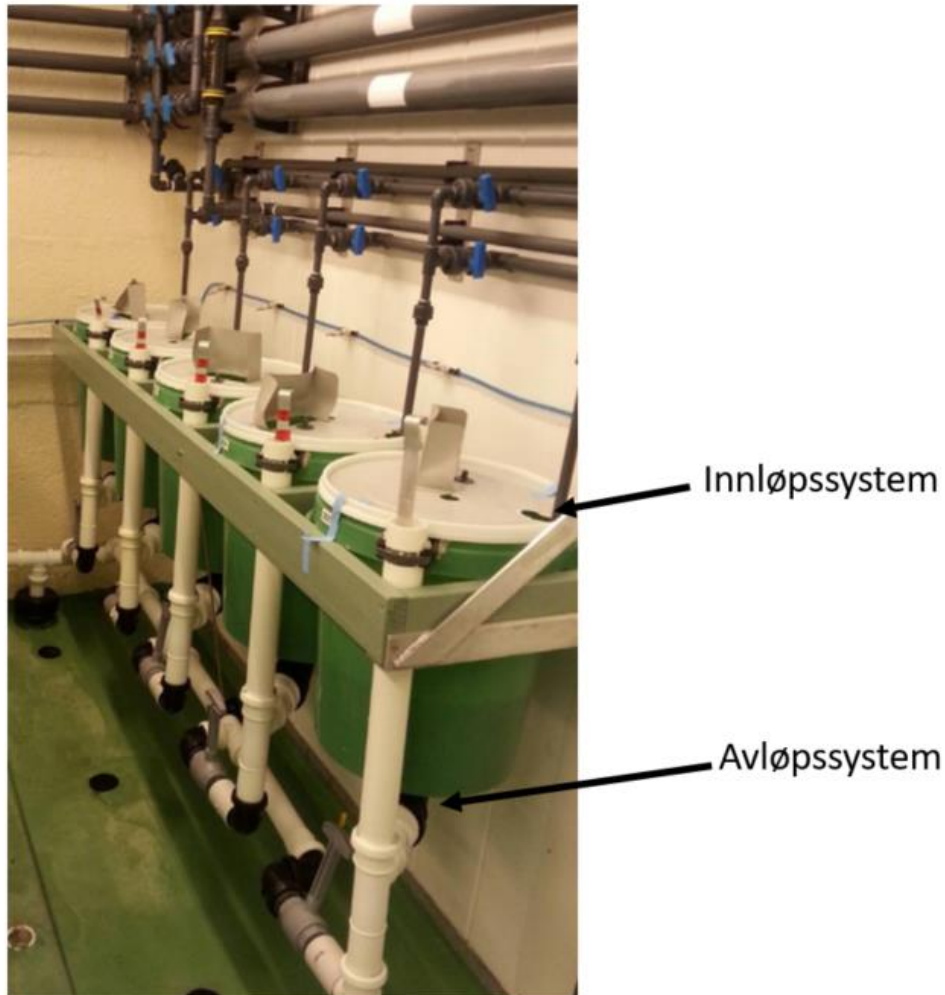
## 4.5 Eksperimentelt, innledende smitteforsøk

### 4.5.1 Oppstalling av kråkeboller for smitteforsøk

Et eksperimentelt, innledende smitteforsøk ble utført ved fiskehelselaboratoriet hos Havbruksstasjonen i Tromsø AS. Det ble benyttet 72 stk. friske, grønne kråkeboller, og disse ble fordelt i 6 tanker (A, B, C, D, E og F) med 12 stk. kråkeboller i hver tank. Tankene inneholdt et avløpssystem som kontinuerlig drenerte ut sjøvann i fra bunnen av tankene, samt et innløpssystem som kontinuerlig tilførte friskt, rent sjøvann inn i tankene. Figur 10 viser et fotografi av tankene som ble benyttet. Hver tank rommet 30 liter, men inneholdt under hele smitteforsøket bare 20 liter sjøvann. Vannet hadde en temperatur på omtrent 12 °C, en oksygenmetning på ca. 100% og en salinitet lik sjøvannet på yttersiden av havbruksstasjonen. Før vannet ble drenert



ut fra anlegget på havbruksstasjonen tilbake til sjøen, ble det kokt opp til 90 °C. Dette ble utført for å drepe alt av smitteagens.



Figur 10: Fotografi av tankene ved fiskehelselaboratoriet i Kårvika som ble benyttet i det eksperimentelle smitteforsøket, hvor friske *S. droebachiensis* ble introdusert for *Vibrio sp. CF002* og *-TL006*. Foto: Solveig Bentald

#### 4.5.2 Oppdyrking av bakterier for smitteforsøk

Bakteriene som ble benyttet ved smitteforsøket var isolatene *Vibrio sp. CF002* og *-TL006*, isolert ved det pågående doktorgradsprosjektet. Oppdyrkingen av disse to bakteriene ble utført i FMAP broth på shaker (1000 rpm) ved 12 °C i ca. 24 timer. Etter tilnærmet 24 timer ble absorbansen (OD600) målt med spektrofotometeret BioMate 3 (Thermo Scientific, Waltham, USA), med den hensikt å beregne konsentrasjonen av bakterieceller i 1 ml FMAP broth (1 abs. = ca.  $10^9$  cfu/ml). Beregnet bakteriekonsentrasjon ble benyttet for tillaging av FMAP broth med  $10^6$

–  $10^7$  cfu/ml, samt for utregning av hvilken mengde FMAP broth med bakterie som skulle tilsettes tankene med 20 liter sjøvann.

#### 4.5.3 Besmitte kråkeboller med bakterie

For miljøtilpasning og stressreduksjon av kråkebollene ble kråkebollene oppbevart i sine tildelte tanker i ca. 48 timer. Videre ble det dannet overflatesår på kråkebollene i tank B, D og E. Dette vil si at i et område på 1 – 1,5 cm på kråkebollens overflate ble piggene klippet av, i tillegg til at området ble oppskrapet med en skalpell.

24 timer etter sår dannelsen ble kråkebollene i tank A og B eksponert for bakterien *Vibrio sp. TL006*, mens kråkebollene i tank C og D ble eksponert for bakterien *Vibrio sp. CF002* (se figur 11). Eksponeringen av bakterie ble utført ved at kråkebollene med tilført sår fikk sprøytet 500  $\mu$ L FMAP broth med bakterie (ca.  $10^6$  –  $10^7$  cfu/ml) over sårområdet, før de videre ble plassert i tildelt tank med innhold av omtrent  $10^6$  –  $10^7$  cfu/ml sjøvann. Kråkebollene uten sår fikk ikke sprøytet bakterier over seg, men ble direkte plassert i tildelt tank med innhold av omtrent  $10^6$  –  $10^7$  cfu/ml sjøvann. Avløpet og tilførselen av rent vann ble i alle tankene stengt av i 2 timer, før alt vann ble drenert ut og nytt vann ble tilført. Kråkebollene i tank A, B, C og D lå dermed og badet i bakterier i 2 timer. Kråkebollene i kontrollgruppene (tank E og F) ble ikke besmittet med bakterie, og ble derfor bare eksponert for de bakteriene som allerede var tilstede i/på dyrene eller i vannet i løpet av de to timene.

	Kontrollgrupper	Eksponert for <i>Vibrio sp. TL006</i>	Eksponert for <i>Vibrio sp. CF002</i>
Uten sår	Tank F	Tank A	Tank C
Tilført sår	Tank E	Tank B	Tank D

Figur 11: Tankoppsettet/forsøksdesignet for det eksperimentelle smitteforsøket utført ved havbruksstasjonen. De grønne kråkebollene ble fordelt i 6 tanker/grupper, der kråkebollene i tank F verken ble tilført sår eller eksponert for bakterie, tank E fikk tilført sår, tank A ble eksponert for *Vibrio sp. TL006*, tank B ble tilført sår og eksponert for *Vibrio sp. TL006*, tank C ble eksponert for *Vibrio sp. CF002*, og tank D ble tilført sår og eksponert for *Vibrio sp. CF002*.

#### 4.5.4 Forløpet av smitteforsøk etter besmittelse med bakterie

Etter at kråkebollene ble eksponert for bakterie pågikk det eksperimentelle smitteforsøket videre i fire uker før det ble avsluttet. I løpet av disse fire ukene oppholdt kråkebollene seg i sine tildelte tanker, med et lysregime som besto av 12 timer lys per 12 timer mørke. Hver uke ble kråkebollene studert visuelt, men personalet ved havbruksstasjonen hadde kontinuerlig overblikk over kråkebollene. To uker inn i forsøket ble kråkebollene fôret med pellet fått av Nofima. Ved forsøkets endelse ble kråkebollene fraktet på is til laboratoriet ved NFH, hvor de ble studert, fotografert og tatt mikrobiologiske prøver av (se «4.6 Prøvetakning» for beskrivelse av prøvetakningen).

### 4.6 Prøvetakning av Kråkeboller

Det ble tatt prøver av overflaten, coelomvæsken og peristomal membran til 12 stk. friske *S. droebachiensis*. I tillegg ble det tatt prøver av overflaten og coelomvæsken til kråkebollene som hadde vært med i det eksperimentelle smitteforsøket. Metodene for prøvetakningen er nærmere beskrevet nedenfor.

Forut for prøvetakningen ble hver kråkebolle skylt i sterilt sjøvann.

#### 4.6.1 Prøvetakning av coelomvæske (CF)

Prøvetakning av coelomvæske (CF) ble utført ved at en sprøyte med kanyle (størrelse 1,2x40mm) ble stukket igjennom peristomal membran og inn i coelomic hulrom. Omtrent 1,5 ml CF ble deretter tappet ut fra coelomic hulrom og fordelt etter følgende: (I) 1 ml CF ble fordelt i to rør og oppbevart med 40% glyserol i en 1:1 løsning i -80 °C, mens (II) 100 µL CF ble benyttet til utsæd av bakterier på FMAP agar. Agarskålen med tilført CF ble satt til inkubering i 12 °C for dyrkning av bakterier.

#### 4.6.2 Prøvetakning av overflaten/test part (TP)

Prøvetakning av overflaten til kråkebollene ble utført noe ulikt i forhold til om kråkebollene hadde lesjondannelse eller ikke. Om kråkebollene hadde lesjondannelse ble skadeområdet med lesjon tatt prøve av, mens om kråkebollene ikke hadde lesjondannelse ble det tatt prøver av et tilfeldig område på kråkebollens overflate. Overflateprøvene (TP) ble tatt ved at området med/uten lesjon ble skrapet med en skalpell, slik at en fikk noe utskrap av det vevet som befant seg på prøvetakningsområdet. Utskraket ble overført til to eppendorfrør med innhold av 1 ml

sterilt sjøvann, og begge eppendorfrørene ble deretter mikset godt. 1 ml veske fra det ene eppendorfrøret ble fordelt i to rør og oppbevart med 40% glyserol i en 1:1 løsning i -80 °C, mens 100 µL veske fra det andre eppendorfrøret ble benyttet til utsæd av bakterier på FMAP agar. Agarskålen med tilført TP-suspensjon ble satt til inkubering i 12 °C for dyrkning av bakterier.

#### 4.6.3 Prøvetakning av peristomal membran (PM)

Prøvetakning av peristomal membran (PM) ble bare utført på de 12 friske, grønne kråkebollene oppsamlet like utenfor Tromsø, og ikke på kråkebollene fra det eksperimentelle smitteforsøket. Prøvetakningen foregikk ved at PM ble klippet/skjært ut fra kråkebollene og most i 2 ml sterilt sjøvann. 1 ml PM-suspensjon ble deretter fordelt i to rør og oppbevart med 40% glyserol i en 1:1 løsning i -80 °C, mens 100 µL PM-suspensjon ble benyttet til utsæd av bakterier på FMAP agar. Agarskålen med tilført PM-suspensjon ble, i likhet med agarskålene med tilført CF eller TP, satt til inkubering i 12 °C for dyrkning av bakterier.

#### 4.7 Isolering av dyrkbare bakterier fra råmateriale

Omtrent en uke etter prøvetakning ble agarskålene med tilført råmateriale fra *S. droebachiensis* studert, før enkeltkolonier med lignende morfologi som *Vibrio sp.* ble selektert og isolert (se «4.8.1 Morfologisk undersøkelse av kolonier» for beskrivelse av hvordan den morfologiske undersøkelsen ble utført). Med andre ord ble enkeltkolonier med lik morfologi som *Vibrio sp.* plukket ut, sådd ut på ny FMAP agar og inkubert ved 12 °C i ca. 5-7 dager, slik at bakterieisolatene ble rendyrket. Bakterieisolatene fikk utdelt navn etter hvilke kråkeboller de var isolert fra, samt hvilket prøvemateriale de var isolert fra. De ble videre fryst ned med 20% glyserol i FMAP broth ved -80 °C, for lagring og oppbevaring til senere analyser.



#### 4.8 Morfologisk undersøkelse av bakterieisolater

Ved denne oppgaven ble det utført morfologiske undersøkelser av kolonier og celler på bakterieisolatene. Dette vil si at morfologien til alle dyrkbare bakteriekolonier ved denne oppgaven ble undersøkt, men bare morfologien til isolerte bakterieisolater ble beskrevet.

#### 4.8.1 Morfologisk undersøkelse av kolonier

Morfologisk undersøkelse av bakteriekolonier ble utført ved dyrke frem kolonier på FMAP agar ved 12 °C i 72 timer. Videre ble koloniens kulturelle særtrekk på agarskålene visuelt studert og beskrevet. I tabell 5 vises en oversikt over hvilke særtrekk som ble studert og hvordan de eventuelt ble beskrevet. For å studere om bakteriene viste hemolytisk aktivitet, ble en enkeltkoloni dyrket i 3 ml FMAP broth på shaker (1000 rpm) ved 12 °C i 24 timer. Etter 24 timer ble 1 dråpe FMAP broth med bakterie overført til FMAP blod agar, hvor kolonier ble dyrket frem ved 12 °C i 72 timer. Bakterienes hemolytiske aktivitet ble bestemt ved å studere om det var oppklaring rund koloniene ( $\beta$ -hemolyse), om agaren var mørk og grønnlig under koloniene ( $\alpha$ -hemolyse) eller om agaren var uforandret rundt og under koloniene (ikke hemolyse).

Tabell 5: Oversikt over bakteriekoloniens kulturelle særtrekk som ble studert, samt hvordan de ble beskrevet.

<b>Særtrekk:</b>	<b>Beskrivelse:</b>
Størrelse	Liten (< 1 mm) Middels (1-2 mm) Stor (> 2 mm)
Farge	Farge på koloniene, samt om de er gjennomskinnelige eller ugjennomskinnelige
Form	Rund  Ujevn begrensning 
Konsistens	Mukoid (slimete) Tørr Fet
Beliggenhet i forhold til hverandre	For seg selv med klare grenser Flytende over hverandre med uklare grenser
Hemolyse (FMAP blod agar)	Ikke hemolytisk $\alpha$ -hemolytisk $\beta$ -hemolytisk

#### 4.8.2 Skanning-Elektron-Mikroskopering (SEM)

Morfologisk undersøkelse av bakterieceller ble utført ved hjelp av SEM. Før utførelse av SEM ble bakterieisolatene dyrket i 1 ml FMAP broth på shaker (1000 rpm) ved 12 °C i 24 timer. Deretter ble 100  $\mu$ l oppdyrket bakterie fiksert i 3% glutardialdehyd i PBS, pH 7,3, ved 4 °C i ca. 19 timer. Etter ca. 19 timer ble prøvene med bakterieisolatene transportert til Elektronmikroskopavdelingen ved UiT, hvor de ble sentrifugert (spunnet ned) og tilsatt 2,5%

glutardialdehyd i PBS-buffer. Videre ble dråper av prøvene påsatt på Poly-L-Lysine-coata dekkglass, hvor de ble (I) vasket med PBS-buffer, (II) tilsatt 1% vandig Osmiumtetroxid for 30 min, (III) dehydrert med stigende konsentrasjon av etanol, (IV) tørket med kritisk punkt tørking, (V) tørket i eksikator med silicagel, (VI) montert på aluminiumstubber, (VII) pådampet gull, og tilslutt (VIII) mikroskopert og fotografert med SEM-instrumentet Zeiss Merlin VP Compact (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Munich, Tyskland).

For morfologisk undersøkelse av bakteriecellene ble mikroskoperingsbildene visuelt studert, og særtrekk som celleform, overflatekarakteristikk og forekomst av flagell ble beskrevet.

#### 4.9 Sekvensering av 16S rRNA-genet til bakterieisolater

Sekvensering av 16S rRNA-genet ble utført på isolerte bakterier. For 16S rRNA-sekvensering ble en enkeltkoloni dyrket i 3 ml FMAP broth på shaker (1000 rpm) ved 12 °C i 24 timer benyttet. Etter 24 timer ble 1 ml FMAP broth med bakterie overført til et eppendorfrør og sentrifugert i 10 min ved 8000 rpm, for klargjøring til ekstraksjon av DNA.

##### 4.9.1 DNA-ekstraksjon fra bakteriekultur

DNA-ekstraksjonen av bakteriekulturene ble utført med bruk av DNeasy Blod & Tissue kit fra QIAGEN (Hilden, Tyskland). Anbefalt protokoll tilhørende kittet ble fulgt for utførelse av DNA-ekstraksjonen. Kort fortalt ble bakteriecellene lysert ved hjelp av proteinase K, før lysatet ble pipettert til en spinn-kolonne. Ved sentrifugering ble DNA selektivt bundet til DNeasy-membranen i kolonnen, mens resterende cellekomponenter ble fjernet med to vasketrinn. DNAet ble tilslutt eluert fra membranen med vann.

##### 4.9.2 Amplifisering av 16S rRNA-genet

I forkant av amplifiseringen av 16S rRNA-genet ble DNA-konsentrasjonen i ekstraktene kvantitert ved hjelp av NanoDrop® ND-1000 Spektrofotometer (NanoDrop Products, Wilmington, USA). DNA-konsentrasjonen til templat ved amplifisering skal ideelt være mellom 20 – 50 ng/µl. Dermed ble ekstraktene fortynnet i vann om målt DNA-konsentrasjon var høyere enn 50 ng/µl.

Amplifiseringen ble utført ved hjelp av 16S rRNA Polymerase Chain Reaction (PCR), der det til hver prøve ble tilsatt 2,5 µl Standard *Taq* Buffer (New England Biolabs Inc, Ipswich, USA), 0,3 µl *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs Inc), 0,5 µl GeneAmp dNTPs (Thermo Scientific),

0,5 µl 16S rRNA Forward Primer (Sigma-Aldrich Inc), 0,5 µl 16S rRNA Revers Primer (Sigma-Aldrich Inc), 21,0 µl ultra pure water, samt 1-2 µl templat (mengde valgt ut i fra DNA-konsentrasjonen i ekstrakt). Totalt volum i hver prøve var dermed 26 µl. Instrumentet GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems, California, USA) ble benyttet, med en programinnstilling hvor prøvene ble kjørt i 5 min. ved 95 °C, etterfulgt av 30 sykluser med 95 °C for 30 sek, 55 °C for 30 sek og 72 °C for 1,5 min. Etter 30 sykluser ble prøvene kjørt i 10 min ved 72 °C, før de ble lagret ved 4 °C inntil videre analyse på gelelektroforese og sekvensering.

#### 4.9.3 Gelelektroforese på PCR-produkt

Etter utførelse av 16S rRNA PCR ble det utført en gelelektroforese på PCR-produktet, for å kontrollere at en hadde fått oppkopierte 16S rRNA-genet. Gelen som ble laget til gelelektroforesen besto av TEA-buffer, 1% Agarose og 0,01% etidiumbromid. Over gelen ble det tilsatt destillert vann, mens i kamrene ved siden av gelen ble det tilsatt TEA-buffer. Ladderene GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) ble benyttet, og prøvene ble blandet med 6X DNA Loading Dye (Thermo Scientific) før de ble tilsatt til brønnene på gelen. Elektroforesen ble utført ved bruk av instrumentet Power PAC 300 fra BIO-RAD, med en spenning på 200V i 11 min. For synliggjøring og billedtaking av gelen og bånd for 16S rRNA-genet ble instrumentet GeneGenius Bio Imaging System (Syngene, Cambridge, England) benyttet.

#### 4.9.4 Rensing av PCR-produkt

Kittet QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) ble benyttet for rensing av PCR-produkt. Anbefalt protokoll tilhørende kittet ble fulgt for utførelse av DNA-rensingen. Kort fortalt ble det tilsatt bindingsbuffer direkte til PCR-produktet, før blandingen ble pipettert til en spinnkolonne. Ved sentrifugering ble nukleinsyrer selektivt bundet til silikamembranen i kolonnen, mens urenheter ble fjernet med ett vasketrinn. Renset DNA ble tilslutt eluert fra membranen med en liten mengde vann.

#### 4.9.5 Sekvensering av nukleotidsekvensen

Forut for bestemmelsen av nukleotidsekvensen til 16S rRNA-genet ble det utført en ny PCR, hvor hver prøve ble tilsatt 15 µl ultra pure water, 2 µl sequencing buffer (Applied Biosystems), 1 µl Big Dye (Applied Biosystems), 1 µl 16S rRNA Revers Primer (Sigma-Aldrich Inc) og 4-5 µl templat (mengde valgt ut i fra DNA-konsentrasjonen i rensede PCR-produkt). Instrumentet GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems) ble benyttet for PCR-analysen, med en

programinnstilling hvor prøvene ble kjørt i 5 min. ved 95 °C, etterfulgt av 40 sykluser med 95 °C for 10 sek, 55 °C for 10 sek og 60 °C for 4 min. Deretter ble prøvene lagret ved 4 °C, før selve sekvenseringen ble utført.

Sekvenseringen av nukleotidsekvensen til 16S rRNA-genet ble utført av Medisinsk Genetisk avdeling på Universitetssykehuset Nord Norge (UNN) ved hjelp av kapillærelektroforese-instrumentet 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

#### 4.9.6 Sekvensbehandling

Programmet CLC Sequence Viewer 7.7 (QIAGEN) og programmet Sequence Scanner Software (Applied Biosystems) ble benyttet for databehandling av nukleotidsekvensene til de ulike bakterieisolatene. Sekvensbehandlingen ble utført ved at to duplikater av 16S rRNA-gensekvensen til et bestemt isolat ble overlappet med hverandre. Overlappingen av to sekvensduplikater ble utført for å forsikre at en fikk en resulterende gensekvens med riktig nukleotidsammensetning for det bestemte isolatet. Den resulterende 16S rRNA-gensekvensen til isolatet ble videre søkt opp mot tilgjengelig data i databasen ved National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), hvor nukleotidlikheten mellom sekvensen til bestemt isolat og sekvensene til bakteriene i databasen ble oppgitt i prosent. Den bakterien i databasen som viste best sekvenslikhet med sekvensert isolat, ble angitt som identitet for den bestemte isolaten.

#### 4.10 Sekvensering av *RecA*-genet til bakterieisolater

*RecA*-sekvenseringen ble utført på tilnærmet samme måte som for sekvensering av 16S rRNA-genet (se «4.9 16S rRNA-sekvensering»), da protokollen for DNA-ekstraksjonen, gelelektroforesen, rensingen av PCR-produkt, selve sekvenseringen av nukleotidsekvensen og databehandlingen av sekvensen hos begge metodene var identisk. Derimot ble det benyttet andre primere og annen mengde med primer ved amplifiseringen og sekvenserings-PCRen av *recA*-genet, i tillegg til at amplifiseringen av *recA*-genet ble utført med en ulik programinnstilling. De endrede betingelsene er gjengitt nedenfor.

Amplifiseringen av *recA*-genet ble utført ved at hver prøve ble tilsatt 2,5 µl Standard *Taq* Buffer (New England Biolabs Inc.), 0,3 µl *Taq* DNA polymerase (New England Biolabs Inc), 0,5 µl dNTPs (Thermo Scientific), 0,5 µl *recA* Forward Primer (Sigma-Aldrich Inc), 0,5 µl *recA* Revers Primer (Sigma-Aldrich Inc), 16,7 µl ultra pure water, samt 1-2 µl templat (mengde valgt ut i fra DNA-



konsentrasjonen i ekstrakt). Totalt volum i hver prøve var dermed 21 µl. Det ble benyttet en programinnstilling hvor prøvene ble kjørt i 5 min ved 95 °C, etterfulgt av 3 sykluser med 95 °C for 45 sek, 55 °C for 2 min og 72 °C for 1 min, som igjen ble etterfulgt av 30 sykluser med 95 °C for 20 sek, 55 °C for 1 min og 72 °C for 1 min. Etter de siste 30 syklusene ble prøvene kjørt i 7 min ved 72 °C, før de ble lagret ved 4 °C inntil videre analyse på gelelektroforese og sekvensering.

Sekvenserings-PCRen ble utført ved at hver prøve ble tilsatt 10 µl ultra pure water, 2 µl sequencing buffer (Applied Biosystems), 1 µl Big Dye (Applied Biosystems), 2,5 µl *recA* Revers Primer (Sigma-Aldrich Inc) og 4-5 µl templat (mengde valgt ut i fra DNA-konsentrasjonen i rensert PCR-produkt). Programinnstillingen som ble benyttet for *recA*-sekvenserings-PCRen var lik som programinnstillingen til 16S rRNA-sekvenserings-PCRen.

#### 4.11 Helgenomanalyse av bakterieisolater

Helgenomanalyse på *Vibrio sp. TL006 og -CF002*, ble utført som en del av det pågående doktorgradsprosjektet. Med andre ord utførte Jonathan Hira DNA-ekstraksjon på bakteriene, før han sende DNA-ekstraktene til firmaet MicrobesNG (Birmingham, England) for selve analysen. Analyseresultatet av bakteriefamilie, -slekt og art, samt resulterende nukleotid-sekvens fått av MicrobesNG ble benyttet ved denne oppgaven.

Resulterende nukleotidsekvenser ble opplastet i dataprogrammet RAST (<http://rast.nmpdr.org>). Dette for videre prosessering, slik at en med det tilhørende programmet the Seed Viewer (<http://www.theseed.org>) kunne sub-kategorisere gensekvensene etter hva genene kodet for. For søk og identifikasjon av enkelte virulensgener ble proteinsekvensen til et spesifikt bestemt gen søkt på og innhentet hos UniProt (<http://www.uniprot.org/>), før innhentet sekvens ble BLAST-søkt med resulterende nukleotidsekvenser.

#### 4.12 MALDI-TOF MS-analyse av bakterieisolater

For analysering på MALDI-TOF MS ble en enkeltkoloni dyrket i 3 ml FMAP broth på shaker (1000 rpm) ved 12 °C i 24 timer benyttet. Etter 24 timer ble 1 ml FMAP broth med bakterie overført til et eppendorfrør og sentrifugert i 2 min ved 10 000 g, før supernatant ble pipettert ut. Pelleten ble deretter ekstrahert for protein.

#### 4.12.1 Proteinekstraksjon

Proteinekstraksjonen ble utført tilnærmet slik som beskrevet av Freiwald og Sauer [117]. 1 ml ultra pure water ble tilsatt til pelleten/prøven, før prøven ble sentrifugert i 2 min ved 10 000 g. Videre ble supernatant pipettert ut, og det ble tilsatt 300 µl ultra pure water og 900 µl 96% etanol. Prøven ble nok en gang sentrifugert i 2 min ved 10 000 g, før supernatant ble pipettert ut og sentrifugeringen ble gjentatt. En mindre pipette ble deretter benyttet til å fjerne resten av supernatanten, slik at bare pelleten lå igjen i eppendorfrøret. Eppendorfrøret ble holdt åpen for 2 – 3 min, slik at pelleten ble helt tørr. Etter tørking ble prøven tilsatt 40 µl 70% maursyre, som ble blandet med pelleten i ca. 2 min. Til slutt ble 40 µl acetonitril tilsatt til prøven, før prøven ble sentrifugert i 2 min ved 10 000 g og lagret ved 4 °C inntil analysering på MALDI-TOF MS. Bakterien *V. anguillarum* LFI 317 [116] ble benyttet som kontroll for proteinekstraksjonen, samt for selve analysen.

#### 4.12.2 Analysering

Analysering av prøve på MALDI-TOF MS ble utført ved avdeling for mikrobiologi og smittevern på Universitetssykehuset Nord-Norge (UNN). Før gjennomføring av selve analysen ble 1 µl proteinekstrakt påført en stålplate kalt MSP 96 target polished steel BC (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Tyskland). Dråpen med proteinekstrakt ble deretter lufttørket, før 1 µl Bruker Matrix HCCA (Bruker Daltonics) ble påført over proteinekstraktet. Etter lufttørking av matrixen ble stålplaten plassert inn i instrumentet Microflex LT (Bruker Daltonics), som genererte biokjemiske spekter ved hjelp av dataprogrammet FlexControl Software (Bruker Daltonics). For både kalibrering og kontroll av analysen ble det benyttet en ekstern Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics), som består av ekstrakt fra *Escherichia coli* DH5 alpha og som dekker en masse ratio på 3600 – 17 000 Da. Parameterne som ble benyttet for analysen er beskrevet i tabell 6.

Tabell 6: Parameterne som ble benyttet for analysering av prøve på MALDI-TOF MS-instrumentet Microflex LT.

<b>Parameter:</b>	<b>Value:</b>
Mass to charge ratio ( $m/z$ ) range:	2000 – 20 000 Da
Laser:	60,0 Hz
Ion source 1:	19,98 kV
Ion source 2:	18,08 kV
Lens:	5,99 kV
Mode:	Positive linear mode
Laser shots:	240 laser shots in 40 shot steps from different positions of the target spot
Extraction delay time:	120 ns
Laser attenuation offset:	21 %

#### 4.12.3 Databehandling

Et biokjemisk spekter produsert ved analysering av prøve på MALDI-TOF MS ble, ved hjelp av dataprogrammet MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics), sammenlignet med referansespekter i enten utviklet database eller databasen fra Bruker. MALDI Biotyper kalkulerte en logaritmisk «score value», basert på hvor godt referansespekter i databasen samsvarte med prøvens spekter. Kalkuleringen av score value ble utført med en «matching-algoritme», og er detaljert beskrevet i appendiks 1. Benyttet betydning av kalkulert score value er vist i tabell 7. De ti referansespektrene som fikk høyest score value ble rangert i en liste, hvor referansespektret med høyest score value ble plassert øverst i listen. Bakterien tilhørende dette referansespektret ble derfor oppgitt som mest sannsynlig identitet til prøven.

Tabell 7. Betydningen av Score Value, kalkulert av dataprogrammet MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics). Isolatene som er identifisert med en score value over 2,3 er antatt å være identifisert som korrekt slekt og art, isolatene som er identifisert med en score value mellom 2,0 og 2,3 er antatt å være identifisert med korrekt slekt og trolig korrekt art, isolatene som er identifisert med en score value mellom 1,7 og 2,0 er antatt å være identifisert med trolig korrekt slekt og mulig korrekt art, mens isolatene som er identifisert med en score value under 1,7 regnes som ikke mulig å identifisere.

<b>Range</b>	<b>Description</b>	<b>Color</b>
2,300 - 3,000	Highly probable species identification	Green
2,000 - 2,299	Secure genus identification, probable species identification	Green
1,700 - 1,999	Probable genus identification	Yellow
0,000 - 1,699	Not reliable identification	Red

#### 4.12.4 Utvikling av MALDI-TOF MS database

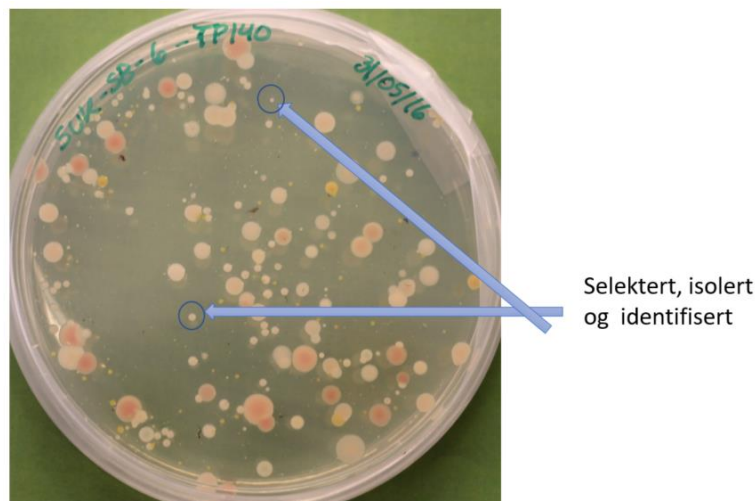
MALDI-TOF MS database ble utviklet ved at fem enkeltkolonier (fem biologiske replikaer) fra hver bakterie ble dyrket i hver sin FMAP broth ved 12 °C i 24 timer. Videre ble de fem biologiske replikaene fra hver bakterie ekstrahert slik som beskrevet i «4.12.1 Protein-ekstraksjon», og analysert slik som beskrevet i «4.12.2 Analysering». Analyseringen ble utført fem ganger (fem tekniske replikaer) på hver biologisk replika, slik at det ble 25 spekter totalt for hvert bakterieisolat (5 biologiske replikaer x 5 tekniske replikaer). Kvaliteten til hvert spekter ble vurdert med dataprogrammet mMass 5.5.0 (Martin Strohm, 2013, <http://www.mmass.org>), etter utførelse av «smoothing» (Savitzky Golay algoritme) og «baseline correction» (TopHat algoritme) på råspektrene. Spekter med utilstrekkelig kvalitet ble fjernet fra samlingen, og ytterligere målinger ble gjennomført for å oppnå 25 spekter for hver bakterie. Råspektrene ble deretter lastet inn i MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics), og utav disse ble det opprettet main spectra (MSPs)/referansespekter for innsetting til egenutviklet database. Se appendiks 1 for detaljert beskrivelse av dataprosessen for utvikling av MSPs og database.

## 5 Resultater

Upubliserte funn fra pågående doktorgradsprosjekt hos forskningsgruppen Marin Bioprospektering ved NFH indikerte at bakterieisolater tilhørende *V. splendidus* klade, isolert fra syke *S. droebachiensis* fra et oppdrettsanlegg, kunne være patogen for arten *S. droebachiensis*. Særlig to *Vibrio*-isolater, navngitt *Vibrio sp. TL006* og *Vibrio sp. CF002*, var spesielt interessante i forhold til sykdom hos de grønne kråkebollene. Observasjonen dannet grunnlaget for denne hypotesen: Bakteriearter innenfor *V. splendidus* klade kan assosieres med symptomer som karakteriseres som skallet kråkebollesyndrom hos arten *S. droebachiensis*.

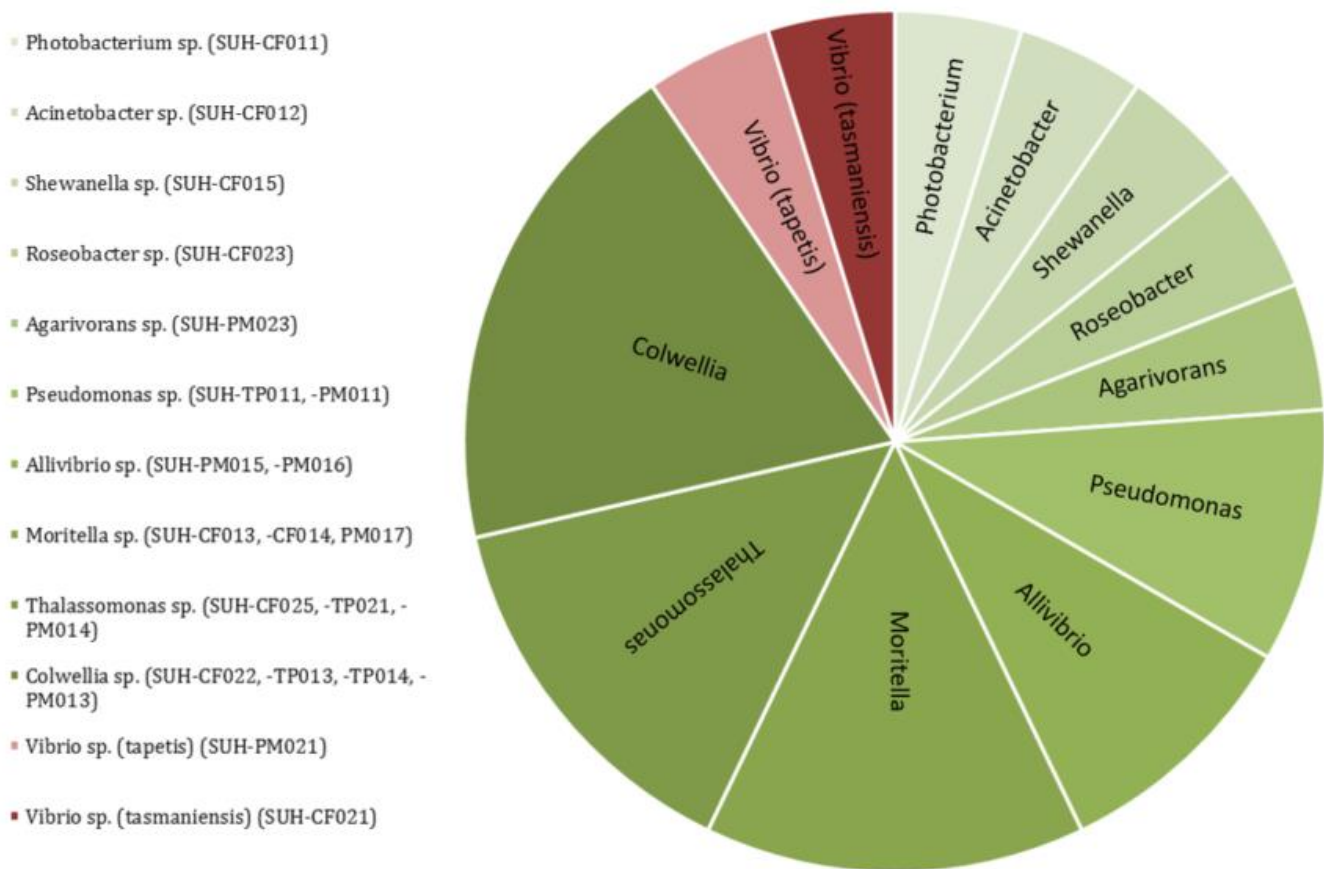
### 5.1 Identifisering av bakterieisolater fra friske *S. droebachiensis*

For å teste den overnevnte hypotesen var det viktig å utelukke tilstedeværelse av bakterier tilhørende *V. splendidus* klade hos friske *S. droebachiensis*. Prøvemateriale fra 12 stk. friske *S. droebachiensis* ble derfor tilført agarskåler, og dyrkbare bakterier tilstedeværende hos kråkebollene ble dyrket opp. Ett par bakteriekolonier med lignende morfologi som *Vibrio sp.* (hvitaktig, runde, små/middels store) fra hver agarskål ble videre selektert og isolert (se eks. i figur 12). Dette resulterte i totalt 21 kolonier som ble valgt ut for videre analyse (se isolatnavn i figur 13). Identifiseringen av de 21 bakterieisolatene ble utført ved hjelp av 16S rRNA-sekvensering.



Figur 12: Eksempel på agarskål med tilført råmateriale fra friske *S. droebachiensis*. En ser vekst av ulike bakterier, med ulik størrelse, konsistens og farge. Likevel ble bare de med lignende morfologi som *Vibrio sp.* selektert og isolert, for videre identifisering med hjelp av 16S rRNA-sekvensering (blå pil). Foto: Solveig Bental

Resultatene etter identifiseringen viste tilstedeværelse av to *Vibrio* sp. blant de 21 isolerte bakteriene fra kråkebollene (se figur 13). Imidlertid tilhørte, ifølge NCBI-databasen, bare én av isolatene *V. splendidus* klade (*V. tasmaniensis*). Resultatene viste i tillegg tilstedeværelse av *Photobacterium*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Roseobacter*, *Agarivorans*, *Pseudomonas*, *Allivibrio*, *Moritella*, *Thalassomonas* og *Colwellia* hos de 12 kråkebollene (se bakterie-distribusjonen i figur 13).



Figur 13: Resultat av 16S rRNA-sekvensering på 21 dyrkbare bakterier, selektert og isolert fra friske *S. droebachiensis*. Navn på isolater er angitt i parentes bak slektsnavnene listet opp til venstre. Isolater identifisert som *Vibrio* sp. er uthevet med rødlig farge, og NCBI-databasens «best match» av art er angitt i parentes bak slektsnavnet.

## 5.2 Eksperimentelt, innledende smitteforsøk på *S. droebachiensis*

### 5.2.1 Karakterisering av *S. droebachiensis* etter utført smitteforsøk

Den overnevnte hypotesen ble også testet ved å utføre et eksperimentelt, innledende smitteforsøk, hvor friske *S. droebachiensis* med/uten tilført sår ble eksponert for enten bakterieisolatet *Vibrio sp. TL006* eller *Vibrio sp. CF002*. Hensikten med forsøket var blant annet å studere om *Vibrio sp. TL006* og/eller *Vibrio sp. CF002* kunne fremkalle sykdomssymptomer hos arten *S. droebachiensis*. Forsøket var et innledende forsøk som skulle gi indikasjon på administrasjon og bestemmelse av parametere ved et reelt, nytt smitteforsøk.

Etter endt smitteforsøk viste kråkebollene i kontrollgruppene E (med sår) og F (uten sår) ingen tegn til lesjondannelse, tap av pigger eller tap av sugeføtter. Derimot hadde kråkebollene en visuelt frisk overflate uten lesjoner og med mange, grønne pigger (se figur 14). I tillegg viste kråkebollene i tank E tegn til utvekst av nye pigger i området hvor kråkebollene var blitt tilført sår.



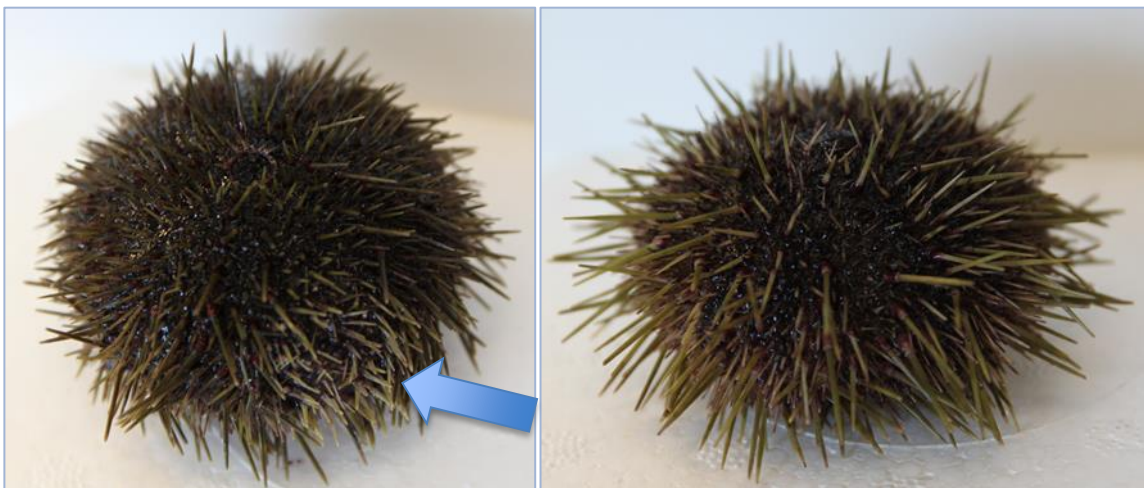
Figur 14: Fotografi av en grønn kråkebolle fra tank F (venstre) og en grønn kråkebolle fra tank E (høyre). Kråkebollene har en visuelt frisk overflate uten lesjoner og med mange, grønne pigger. Kråkebollen fra tank E har god utvekst av nye pigger i området hvor kråkebollen var blitt tilført sår (se blå pil). Foto: Solveig Bentsdal

Kråkebollene i tank A (uten sår) og B (med sår), som var blitt eksponert for *Vibrio sp. TL006*, viste en overflate med noe mørkere farge sammenlignet med kråkebollene fra kontrollgruppene. Likevel var det utseendemessige individuelle forskjeller av overflaten til kråkebollene i tank A og B. Dette vil si at noen kråkeboller lignet mer på kråkebollene fra kontrollgruppene, mens

andre hadde en mørkere overflate med færre pigger (se figur 15 og 16). En kråkebolle i tank A viste synlig tegn til lesjondannelse, samt tap av pigger og sugeføtter i området med lesjon (se fotografiet til høyre i figur 15). Denne kråkebollen skilte seg derfor signifikant ut i forhold til de resterende kråkebollene i tank A og B, da de ikke viste tydelig tegn til karakteristisk lesjondannelse på sin kroppsoverflate. Hos flere av kråkebollene i tank B kunne en se utvekst av nye pigger i området hvor kråkebollene var blitt tilført sår (se fotografiet til venstre i figur 16).



Figur 15: Fotografi av to grønne kråkeboller fra tank A, hvor en kråkebolle er uten synlig lesjon (venstre) og en er med synlig lesjon (høyre, blå pil). Begge kråkebollene har en mørk overflate med relativt få pigger. Foto: Solveig Bentsdal og Jonathan Hira



Figur 16: Fotografi av to grønne kråkeboller fra tank B. Kråkebollen til venstre viser tydelig tegn til utvekst av nye pigger i området hvor kråkebollen var blitt tilført sår (blå pil). Begge kråkebollene har en mørk overflate med relativt få pigger. Foto: Solveig Bentsdal



Kråkebollene i tank C (uten sår) og D (med sår), som var blitt eksponert for *Vibro sp. CF002*, viste etter avsluttet smitteforsøk lignende tendens som kråkebollene fra tank A og B (se figur 17 og 18). Flere av kråkebollene hadde en overflate med noe mørkere farge sammenlignet med kråkebollene fra kontrollgruppene, mens andre igjen lignet kråkebollene fra kontrollgruppene. Med andre ord var det utseendemessige individuelle forskjeller av overflaten til kråkebollene også i tank C og D. Derimot var det til forskjell fra tank A og B ingen antydning til dannelse av lesjon hos noen av kråkebollene i tank C eller D. I tillegg bør det nevnes at hos samtlige kråkeboller i tank D kunne en se god utvekst av nye pigger i området hvor kråkebollene var blitt tilført sår. Imidlertid ble en kråkebolle i tank D tatt prøver av 2 uker etter oppstart av smitteforsøket, da kråkebollen hadde mistet stort sett alle piggene sine, ble spist på av de andre kråkebollene i samme tank, samt var i ferd med å dø.



Figur 17: Fotografi av to grønne kråkeboller fra tank C. Begge kråkebollene har en overflate uten synlig dannelse av lesjon, men med en relativt mørk farge. Foto: Solveig Bentsdal

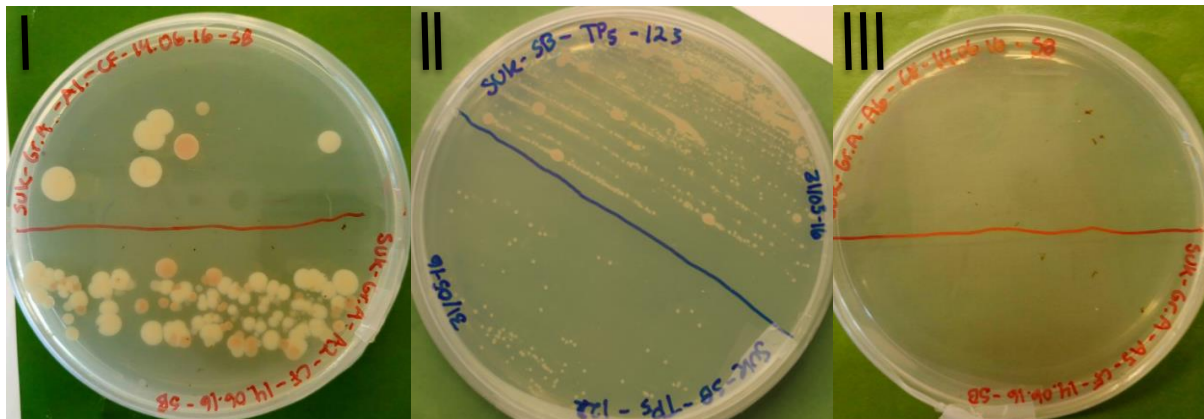


Figur 18: Fotografi av to grønne kråkeboller fra tank D. Begge kråkebollene har en overflate uten synlig dannelse av lesjon, i tillegg til en god utvekst av nye pigger i området hvor kråkebollene var blitt tilført sår (se blå pil i fotografiet til høyre). Foto: Solveig Bentsdal

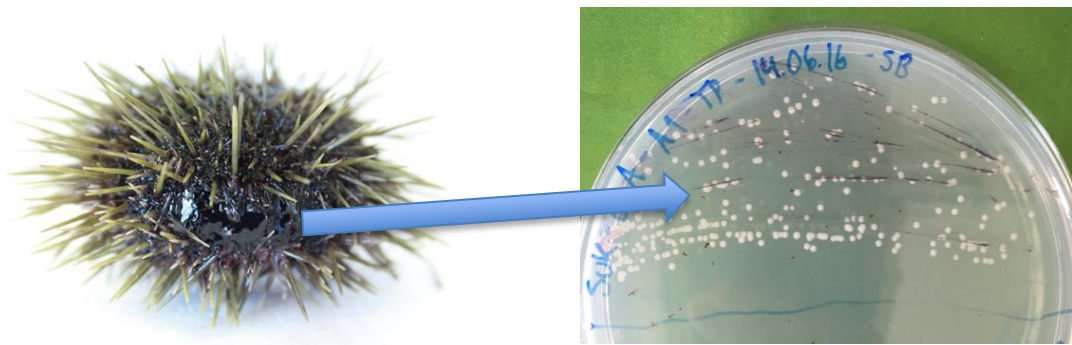
### 5.2.2 Isolering og identifisering av isolater fra *S. droebachiensis*

Etter utført eksperimentelt smitteforsøk ble det tatt mikrobiologiske prøver av hver av forsøksdyrene, med den hensikt å re-isolere bakterieisolatene *Vibrio sp. TL006* og *Vibrio sp. CF002* som deltakende *S. droebachiensis* var blitt eksponert for i starten av smitteforsøket. Isoleringen ble utført for å gi en indikasjon på om de kråkeboller som var blitt smittet med bakterie fortsatt hadde tilstedeværelse av gitt isolat.

Isoleringen ble utført ved å selekttere og isolere en bakterie, med lignende morfologi som *Vibrio sp.*, fra hver agarskål med tilført råmateriale (se navn på isolatene i tabell 8). Ved enkelte agarskåler vokste det opp flere ulike kolonier, mens ved andre agarskåler var det ingen vekst av noen kolonier (se figur 19). På agarskålen med tilført lesjon, fra den kråkebollen med lesjonsdannelse i tank A, dominerte én type bakterie (se figur 20). Dette begrunnes med at det visuelt så ut som vekst av bare en type bakterie på agarskålen, og ingen vekst av andre typer dyrkbare bakterier.



Figur 19: Fotografi av 3 stk. agarskåler med tilført råmateriale fra *S. droebachiensis* som deltok i smitteforsøket. Agarskålene er delt i to, der råmateriale fra en kråkebolle er tilført den ene delen og råmateriale fra en annen kråkebolle er tilført den andre delen. I og II viser vekst av flere ulike bakterier, mens III viser ingen vekst av bakterie. Foto: Solveig Bentsdal



Figur 20: Oppvekst av bakterier på agarskålen med tilført råmateriale fra kråkebollen med lesjondannelse i tank A. Ser umiddelbart ut som én bakterie er dominerende på agarskålen. Foto: Jonathan Hira og Solveig Bentsdal

Identifiseringen av bakterieisolatene ble utført ved hjelp av 16S rRNA-sekvensering. Resultatene etter identifiseringen viste tilstedeværelse av tre *Vibrio sp.* blant de dyrkbare bakteriene fra kråkebollene i tank A, ingen tilstedeværelse av *Vibrio sp.* blant de dyrkbare bakteriene fra kråkebollene i tank B, C og D, en *Vibrio sp.* blant de dyrkbare bakteriene fra kråkebollene i tank E, samt tre *Vibrio sp.* blant de dyrkbare bakteriene fra kråkebollene i tank F (se tabell 8). Alle isolatene identifisert som *Vibrio sp.* var isolert fra ulike kråkebolleindivider, og samtlige av disse isolatenes 16S rRNA-sekvenser viste god match med sekvenser hos flere ulike arter fra *V. splendidus* klade i NCBI-databasen. Bakterieisolaten isolert fra lesjonene til den kråkebollen med lesjondannelse i tank A ble navngitt *SUA-TP-A1* og identifisert som *V. splendidus*.

Tabell 8: Resultat etter utført 16S rRNA-sekvensering på bakterieisolater fra *S. droebachiensis* som deltok i eksperimentelt smitteforsøk. Isolater identifisert som *Vibrio sp.* er uthevet med rød farge, og NCBI-databasens «best match» av art er angitt i parentes bak slektsnavnet.

Sample	Type of bacterium
<b>Gr. A</b>	
SUA-TP-A1	<i>Vibrio sp. (splendidus)</i>
SUA-TP-A2	<i>Sulfitobacter sp.</i>
SUA-TP-A3	<i>Sulfitobacter sp.</i>
SUA-TP-A4	<i>Sulfitobacter sp.</i>
SUA-TP-A5	<i>Primorskyibacter sp.</i>
SUA-TP-A6	<i>Roseobacter sp.</i>
SUA-TP-A7	<i>Marinobacter sp.</i>
SUA-TP-A8	<i>Bacillus sp.</i>
SUA-TP-A12	<i>Sulfitobacter sp.</i>
SUA-CF-A1	<i>Tenacibaculum sp.</i>
SUA-CF-A2	<i>Colwellia sp.</i>
SUA-CF-A3	<i>Vibrio sp. (splendidus)</i>
SUA-CF-A4	<i>Vibrio sp. (splendidus)</i>
SUA-CF-A8	<i>Thalassomonas sp.</i>
<b>Gr. B</b>	
SUA-TP-B1	<i>Roseobacter sp.</i>
SUA-TP-B2	<i>Proteobacter sp.</i>
SUA-TP-B5	<i>Roseobacter sp.</i>
<b>Gr. C</b>	
SUA-TP-C1	<i>Lutibacter sp.</i>
SUA-TP-C4	<i>Rhodobacterales sp.</i>
SUA-TP-C5	<i>Marinobacter sp.</i>
<b>Gr. D</b>	
SUA-2W-TP-D1	<i>Psychromonas sp.</i>
SUA-2W-TP-D2	<i>Celeribacter sp.</i>
SUA-2W-TP-D3	<i>Thalassospira sp.</i>
SUA-2W-CF-D1	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>
SUA-2W-CF-D2	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>
SUA-TP-D4	<i>Roseobacter sp.</i>
SUA-TP-D5	<i>Rhodobacterales sp.</i>
<b>Gr. E</b>	
SUA-TP-E1	<i>Sulfitobacter sp.</i>
SUA-TP-E6	<i>Vibrio sp. (hemicentroti)</i>
SUA-CF-E8	<i>Psychromonas sp.</i>
SUA-CF-E9	<i>Psychromonas sp.</i>
<b>Gr. F</b>	
SUA-TP-F1	<i>Alteromonas sp.</i>
SUA-TP-F4	<i>Roseobacter sp.</i>
SUA-TP-F11	<i>Vibrio sp. (splendidus)</i>
SUA-CF-F5	<i>Vibrio sp. (gallaecicus)</i>
SUA-CF-F9	<i>Vibrio sp. (lentus)</i>

### 5.3 Karakterisering og identifisering av bakterieisolater

På grunn av vanskeligheter med å arts- og stamme-bestemme bakterieisolater tilhørende *Vibrio splendidus* klade, ble det utført videre karakterisering og identifisering av isolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001*, *-CF002* og *SUA-TP-A1* med bruk av ulike metoder.

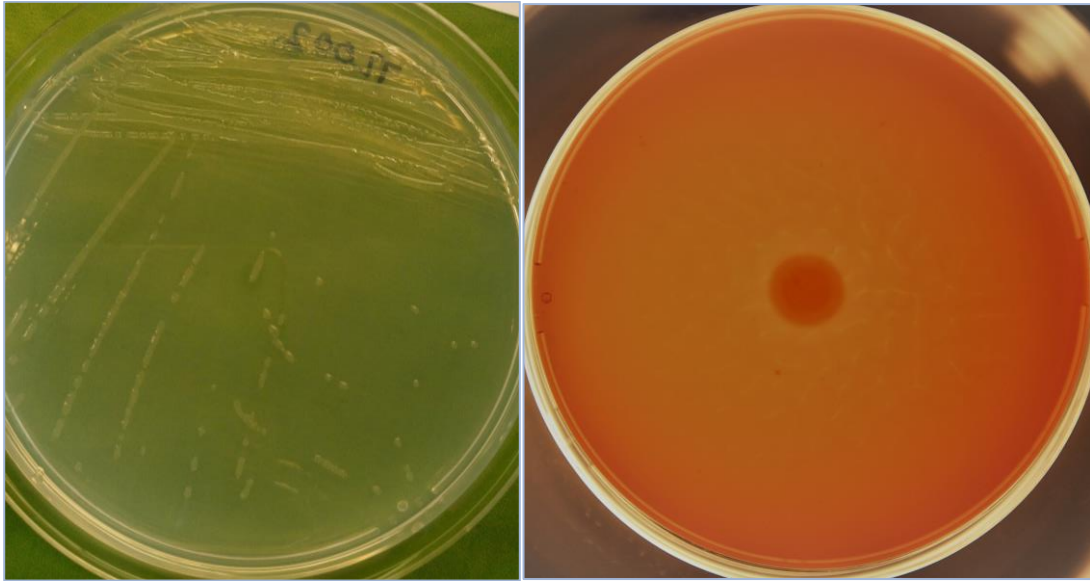
#### 5.3.1 Morfologisk undersøkelse av kolonier og celler

Det ble utført morfologiske undersøkelser på bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001*, *CF002* og *SUA-TP-A1*, for å studere og sammenligne isolatenes kulturelle særtrekk mot hverandre. Morfologisk undersøkelse og hemolytisk aktivitet av kolonier ble utført ved å studere bakteriekoloniene visuelt på FMAP agar og FMAP blod agar, mens morfologisk undersøkelse av celler ble utført ved hjelp av SEM. Nedenfor er bakterieisolatene listet opp, og under navnet til hver av isolatene er det bilder og tabell med beskrivelse av morfologien til kolonier og celler.

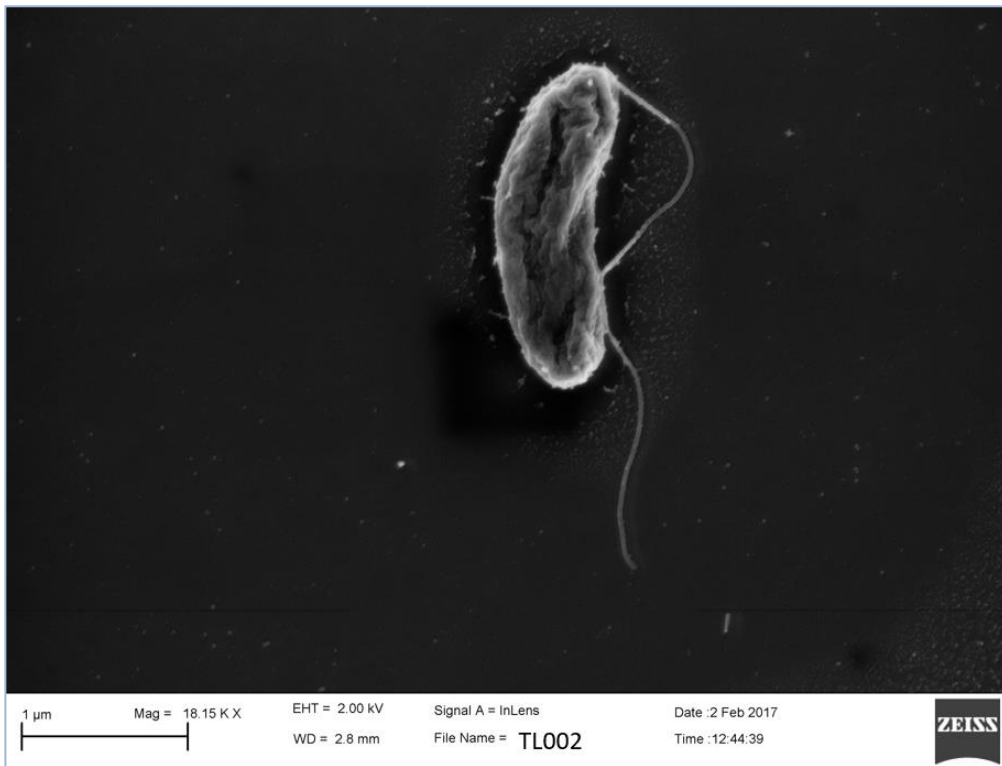
#### *Vibrio sp. TL002:*

Tabell 9: Beskrivelse av morfologien til koloniene (se figur 21) og cellene (se figur 22) til *Vibrio sp. TL002*.

<b>Særtrekk for kolonier:</b>	<b>Beskrivelse av kolonier:</b>	<b>Særtrekk for celler:</b>	<b>Beskrivelse av celler:</b>
Størrelse:	Små	Farge:	Hvitaktig
Farge:	Gulaktig, gjennomskinnelig	Form:	Buet stangform / kommaform
Form:	Rund	Overflate:	Fluktuerende
Konsistens:	Mukoid	Flagell:	Én
Beliggenhet i forhold til hverandre:	Tett. Uklare grenser som flyter inn i hverandre	-	-
Hemolyse:	Ikke hemolytisk	-	-



Figur 21: Fotografi av koloniene til *Vibrio sp. TL002* på FMAP agar og FMAP blod agar. Koloniene er gulaktige, gjennomskinnelige, mukoid, små, har rund form, uklare grenser og er ikke hemolytisk. Foto: Solveig Bental

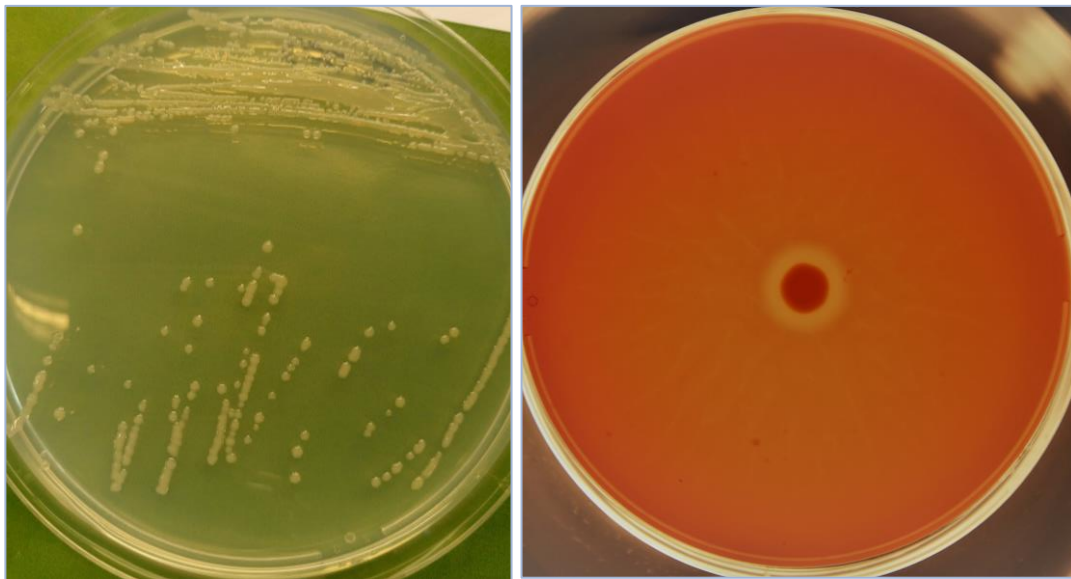


Figur 22: SEM-bilde av cellen til *Vibrio sp. TL002*. Cellen har en buet stangform med en ujevn, fluktuerende overflate og en eneste flagell. Foto: Tom-Ivar Eilertsen

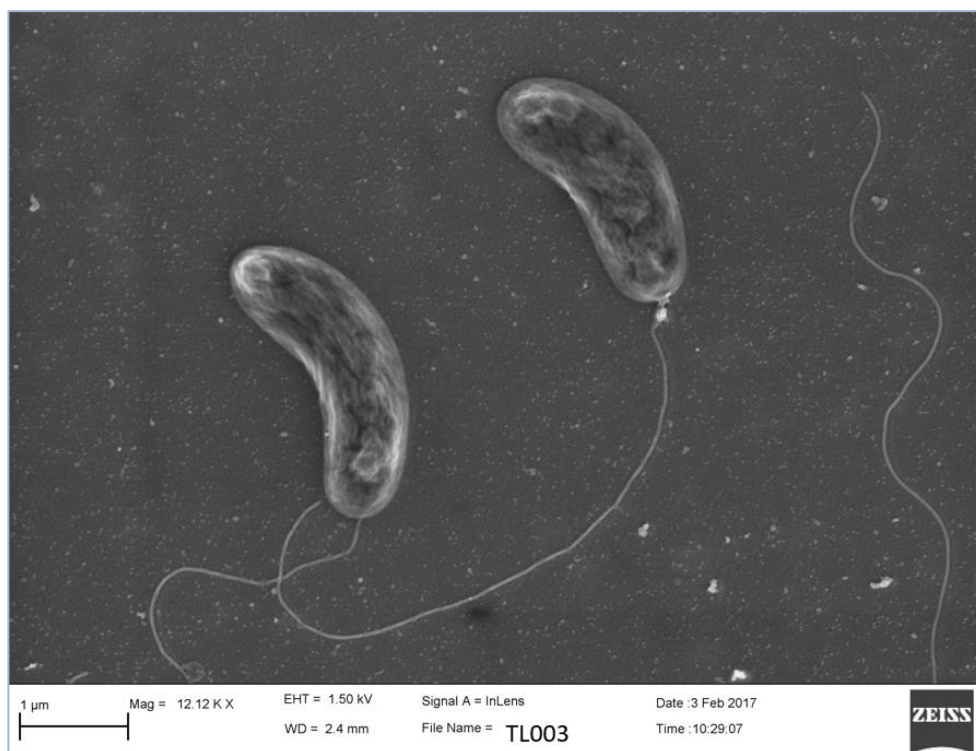
Vibrio sp. TL003:

Tabell 10: Beskrivelse av morfologien til koloniene (se figur 23) og cellene (se figur 24) til *Vibrio sp. TL003*.

Særtrekk for kolonier:	Beskrivelse av kolonier:	Særtrekk for celler:	Beskrivelse av celler:
Størrelse:	Middels stor	Farge:	Hvitaktig
Farge:	Hvitaktig, ugjennomskinnelig	Form:	Buet stangform / kommaform
Form:	Rund	Overflate:	Fluktuerende
Konsistens:	Fet	Flagell:	Én
Beliggenhet i forhold til hverandre:	Sprett med relativt klare grenser	-	-
Hemolyse:	β-hemolytisk	-	-



Figur 23: Fotografi av koloniene til *Vibrio sp. TL003* på FMAP agar og FMAP blod agar. Koloniene er hvite, ugjennomskinnelige, fet, middels stor, har rund form, klare grenser og er β-hemolytisk. Foto: Solveig Bentsdal



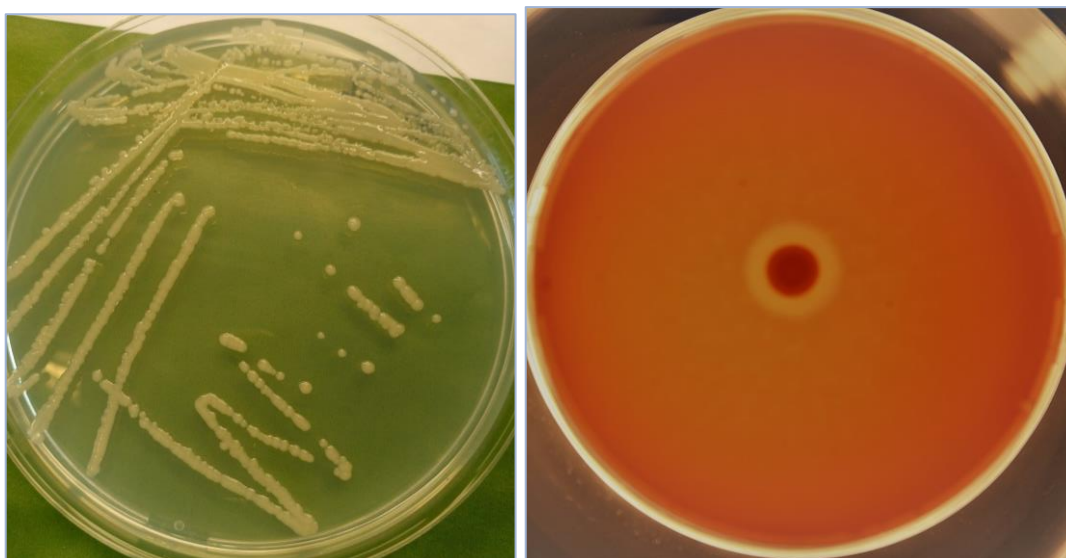
Figur 24: SEM-bilde av cellen til *Vibrio sp. TL003*. Cellen har en buet stangform med en ujevn, fluktuerende overflate og en eneste flagell. Foto: Tom-Ivar Eilertsen

*Vibrio sp. TL006:*

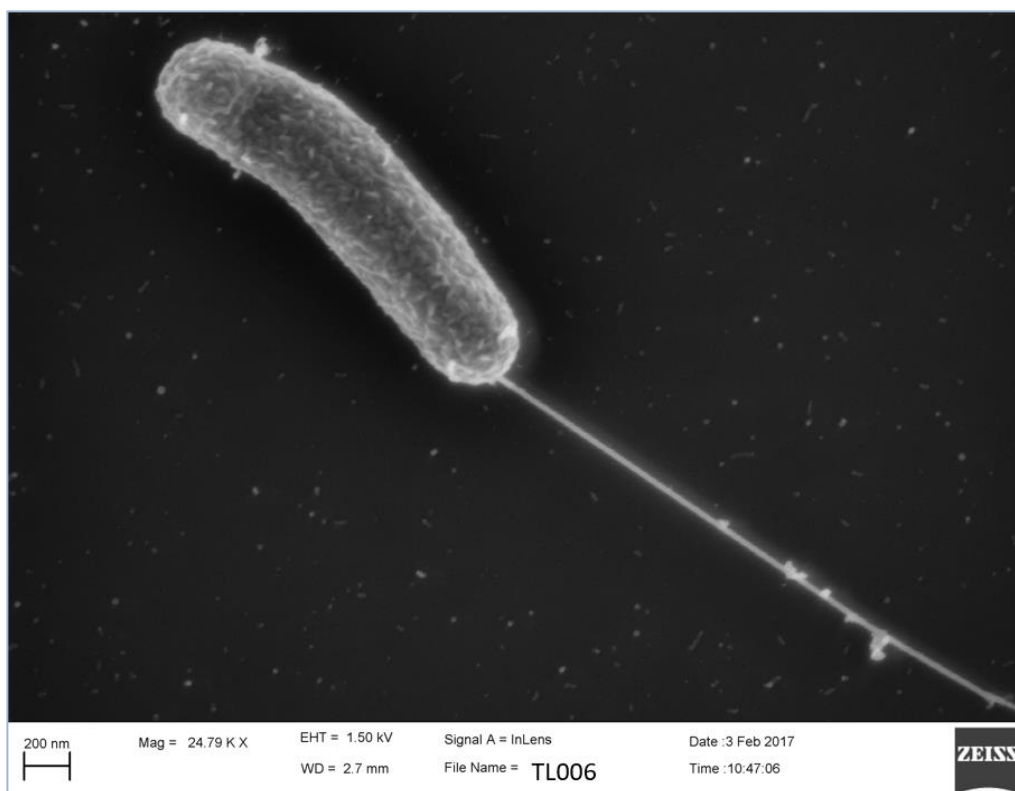
Tabell 11: Beskrivelse av morfologien til koloniene (se figur 25) og cellene (se figur 26) til *Vibrio sp. TL006*.

Særtrekk for kolonier:	Beskrivelse av kolonier:	Særtrekk for celler:	Beskrivelse av celler:
Størrelse:	Middels stor	Farge:	Hvitaktig
Farge:	Hvitaktig, ugjennomskinnelig	Form:	Buet stangform / kommaform
Form:	Rund	Overflate:	Fluktuerende
Konsistens:	Fet	Flagell:	Én
Beliggenhet i forhold til hverandre:	Sprett med relativt klare grenser	-	-
Hemolyse:	$\beta$ -hemolytisk	-	-





Figur 25: Fotografi av koloniene til *Vibrio sp. TL006* på FMAP agar og FMAP blod agar. Koloniene er hvite, ugjennomskinnelige, fet, middels stor, har rund form, relativt klare grenser og er  $\beta$ -hemolytisk. Foto: Solveig Bentdal

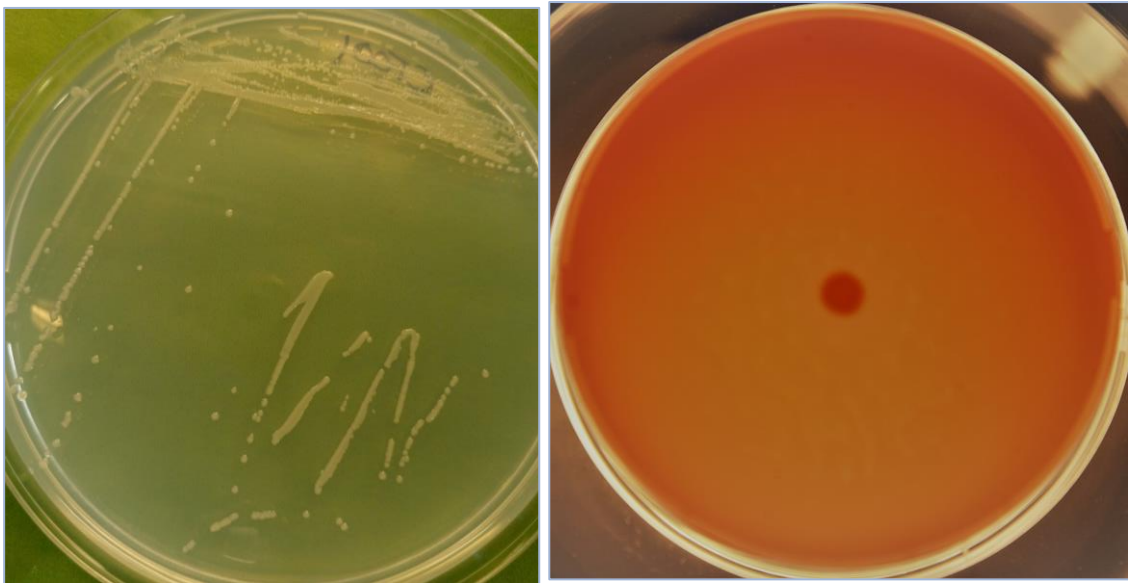


Figur 26: SEM-bilde av cellen til *Vibrio sp. TL006*. Cellen har en buet stangform med en litt fluktuerende overflate og en eneste flagell. Foto: Tom-Ivar Eilertsen

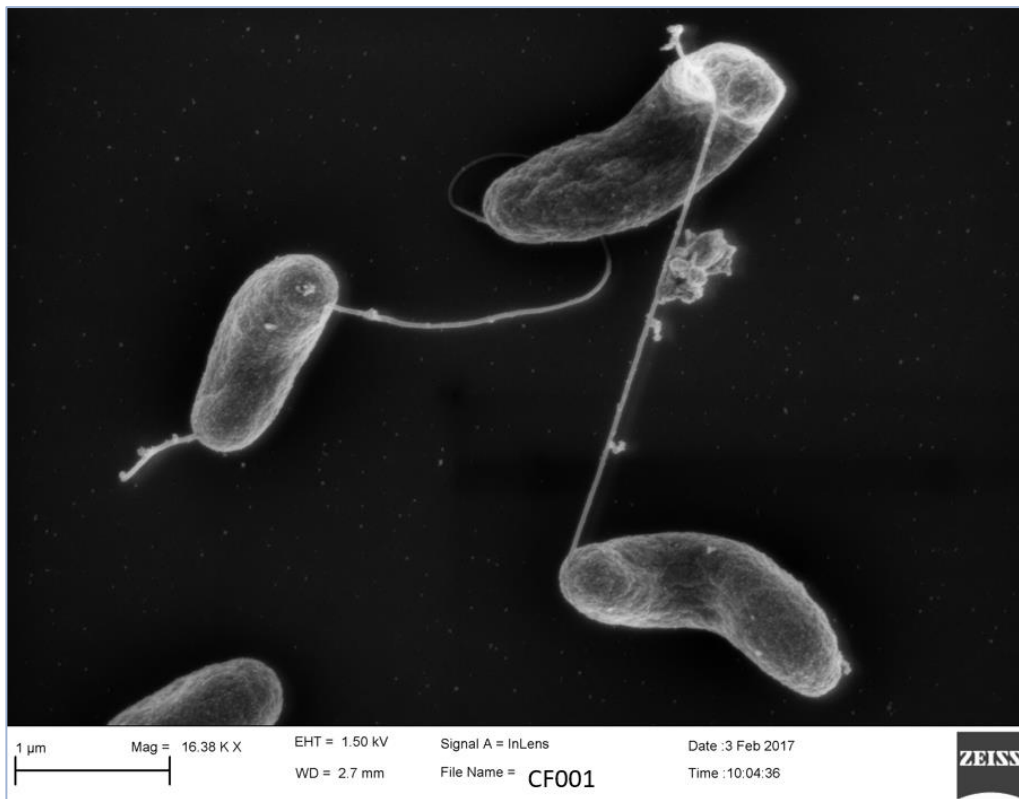
Vibrio sp. CF001:

Tabell 12: Beskrivelse av morfologien til koloniene (se figur 27) og cellene (se figur 28) til *Vibrio sp. CF001*.

Særtrekk for kolonier:	Beskrivelse av kolonier:	Særtrekk for celler:	Beskrivelse av celler:
Størrelse:	Små	Farge:	Hvitaktig
Farge:	Hvitaktig, ugjennomsiktig	Form:	Buet stangform / kommaform
Form:	Rund	Overflate:	Fluktuerende
Konsistens:	Mukoid	Flagell:	Én
Beliggenhet i forhold til hverandre:	Sprett med relativt klare grenser	-	-
Hemolyse:	Ikke hemolytisk	-	-



Figur 27: Fotografi av koloniene til *Vibrio sp. CF001* på FMAP agar og FMAP blod agar. Koloniene er hvite, ugjennomskinnelege, mukoid, små, har rund form, relativt klare grenser og er ikke hemolytisk. Foto: Solveig Bentsdal

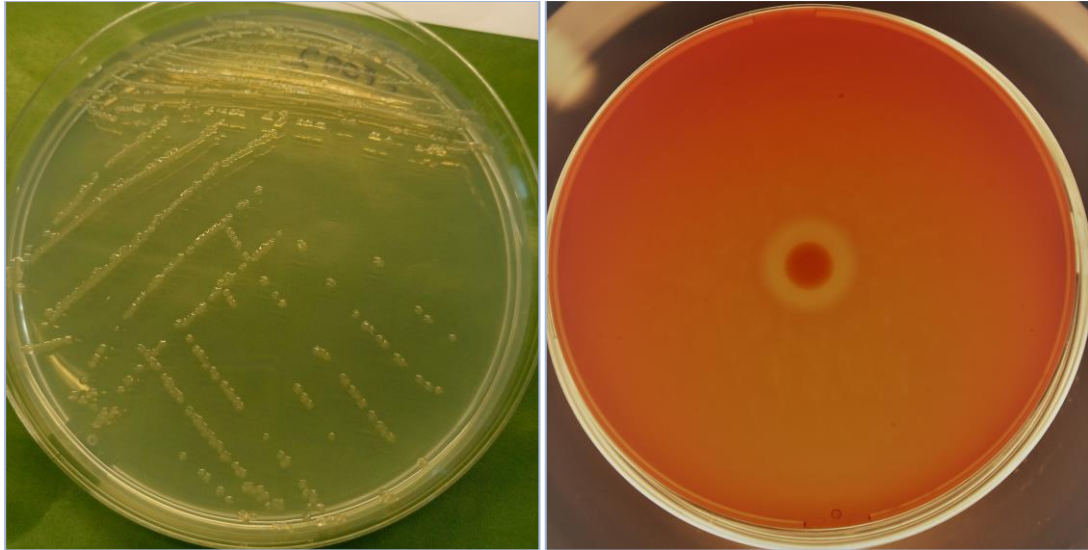


Figur 28: SEM-bilde av cellen til *Vibrio sp. CF001*. Cellen har en buet stangform med en ujevn, fluktuerende overflate og en eneste flagell. Foto: Tom-Ivar Eilertsen

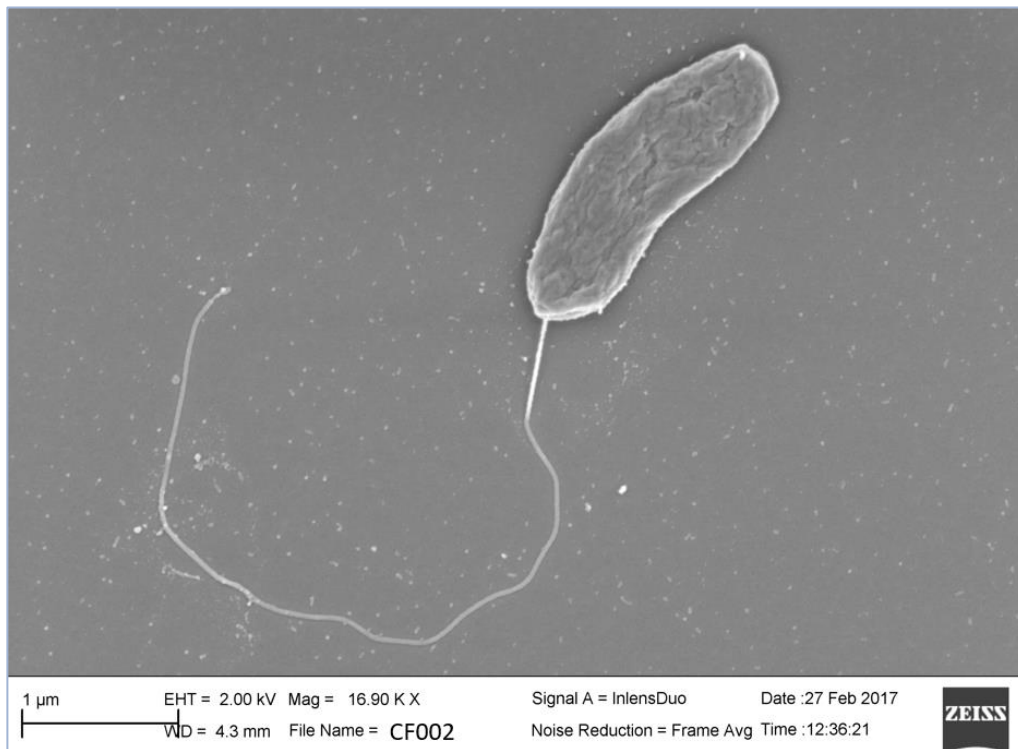
*Vibrio sp. CF002:*

Tabell 13: Beskrivelse av morfologien til koloniene (se figur 29) og cellene (se figur 30) til *Vibrio sp. CF002*.

Særtrekk for kolonier:	Beskrivelse av kolonier:	Særtrekk for celler:	Beskrivelse av celler:
Størrelse:	Middels stor	Farge:	Hvitaktig
Farge:	Gul-hvitaktig, gjennomskinnelig	Form:	Buet stangform / kommaform
Form:	Rund	Overflate:	Fluktuerende
Konsistens:	Mukoid	Flagell:	Én
Beliggenhet i forhold til hverandre:	Sprett med relativt klare grenser	-	-
Hemolyse:	$\beta$ -hemolytisk	-	-



Figur 29: Fotografi av koloniene til *Vibrio sp. CF002* på FMAP agar og FMAP blod agar. Koloniene er hvite/gulaktig, ugjennomskinnelige, mukoid, middels stor, har rund form, klare grenser og er  $\beta$ -hemolytisk. Foto: Solveig Bentsdal

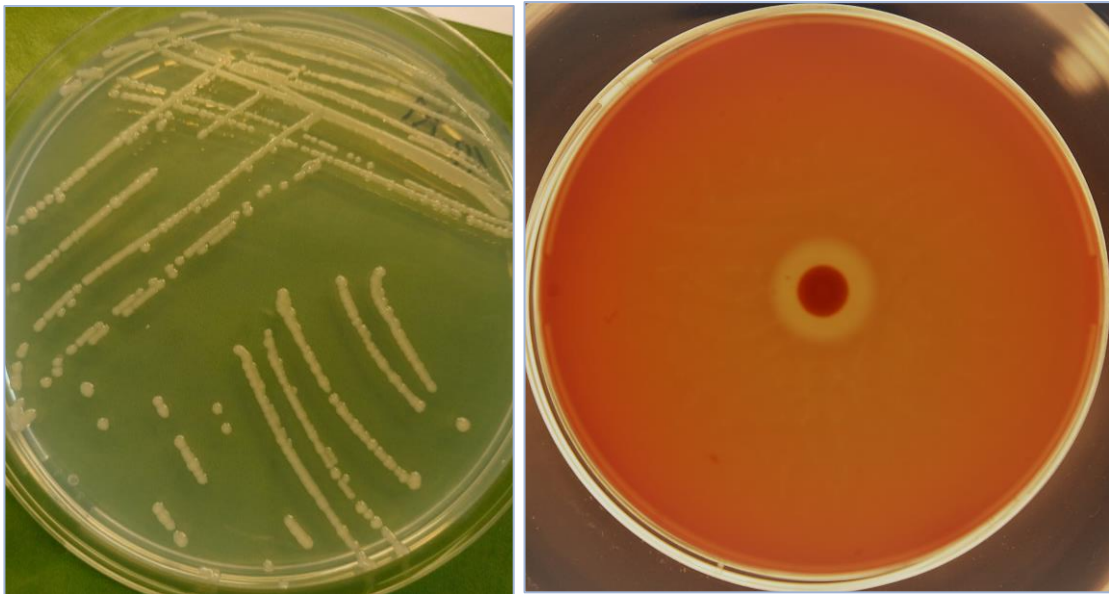


Figur 30: SEM-bilde av cellen til *Vibrio sp. CF002*. Cellen har en buet stangform med en ujevn, fluktuerende overflate og en eneste flagell. Foto: Tom-Ivar Eilertsen

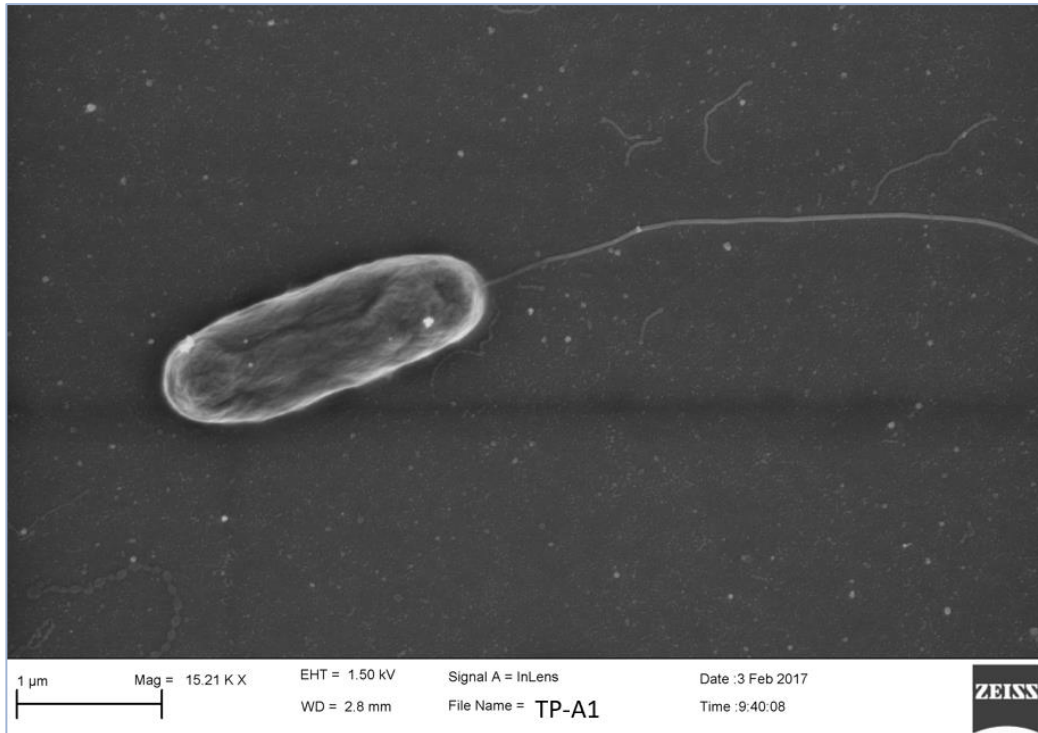
SUA-TP-A1:

Tabell 14: Beskrivelse av morfologien til koloniene (se figur 31) og cellene (se figur 32) til *SUA-TP-A1*.

Særtrekk for kolonier:	Beskrivelse av kolonier:	Særtrekk for celler:	Beskrivelse av celler:
Størrelse:	Middels stor	Farge:	Hvitaktig
Farge:	Hvitaktig, ugjennomsiktig	Form:	Buet stangform / kommaform
Form:	Rund	Overflate:	Fluktuerende
Konsistens:	Fet	Flagell:	Én
Beliggenhet i forhold til hverandre:	Sprett med relativt klare grenser	-	-
Hemolyse:	$\beta$ -hemolytisk	-	-



Figur 31: Fotografi av koloniene til *SUA-TP-A1* på FMAP agar og FMAP blod agar. Koloniene er hvite, ugjennomsiktige, fet, middels stor, har rund form, klare grenser og er  $\beta$ -hemolytisk. Foto: Solveig Bental



Figur 32: SEM-bilde av cellen til *SUA-TP-A1*. Cellen har en buet stangform med en ujevn, fluktuerende overflate og en eneste flagell. Foto: Tom-Ivar Eilertsen

Resultatene etter den morfologiske undersøkelsen av bakterieisolatenes kolonier og celler, viste at isolatene var svært like. De har alle kolonier med rund form, og celler med en buet stangform, fluktuerende overflate og en eneste flagell. Likevel ligner koloniene til *Vibrio sp. TL003*, -*TL006*, og *SUA-TP-A1* mer på hverandre, enn på koloniene til *Vibrio sp. TL002*, -*CF001*, og -*CF002*. Når det er sagt ligner ikke *Vibrio sp. TL002*, -*CF001*, og -*CF002* på hverandre, da *TL002* er mer gjennomskinnelig enn *CF001*, og *CF002* er større og  $\beta$ -hemolytisk i forhold til de to andre.

### 5.3.2 Identifisering ved hjelp av 16S rRNA- og *recA*-sekvensering

Det ble utført en ny 16S rRNA-sekvensering, samt en *recA*-sekvensering på bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, -*TL003*, -*TL006*, -*CF001*, *CF002* og *SUA-TP-A1*, med den hensikt å artsbestemme isolatene. De resulterende 16S rRNA- og *recA*-sekvensene til isolatene ble undersøkt opp mot databasen til NCBI, og samtlige sekvenser viste god match med sekvenser hos flere ulike arter i databasen. I tabell 15 vises isolatenes «best match» av art basert på sammenligning av 16S rRNA-sekvensen til gitt isolat mot 16S rRNA-sekvensen til ulike arter i NCBI-databasen, og i tabell 16 vises isolatenes «best match» av art basert på sammenligning

av *recA*-sekvensen til gitt isolat mot *recA*-sekvensen til ulike arter i NCBI-databasen. Nukleotidlikheten mellom sekvensen til gitt isolat og sekvensen til «best match» er oppgitt i parentes bak artsnavnet.

Tabell 15: Sammenligning av isolater med hensyn på 16S rRNA. Bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, -*TL003*, -*TL006*, -*CF001*, *CF002* og *SUA-TP-A1* sitt resultat for «best mach» av art, basert på sammenligning av 16S rRNA-sekvensen til gitt isolat mot 16S rRNA-sekvensen til ulike arter i NCBI-databasen. Nukleotidlikheten mellom sekvensen til gitt isolat og sekvensen til «best match» er oppgitt i parentes bak artsnavnet.

Sample	Best match of species (16S rRNA Ident)
<i>Vibrio sp. TL002</i>	<i>Vibrio gallaecicus</i> (97%)
<i>Vibrio sp. TL003</i>	<i>Vibrio lentus</i> (98%)
<i>Vibrio sp. TL006</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (98%)
<i>Vibrio sp. CF001</i>	<i>Vibrio cortegadensis</i> (97%)
<i>Vibrio sp. CF002</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (97%)
<i>SUA-TP-A1</i>	<i>Vibrio tasmaniensis</i> (93%)

Tabell 16: Sammenligning av isolater med hensyn på *recA*. Bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, -*TL003*, -*TL006*, -*CF001*, *CF002* og *SUA-TP-A1* sitt resultat for «best mach» av art, basert på sammenligning av *recA*-sekvensen til gitt isolat mot *recA*-sekvensen til ulike arter i NCBI-databasen. Nukleotidlikheten mellom sekvensen til gitt isolat og sekvensen til «best match» er oppgitt i parentes bak artsnavnet.

Sample	Best match of species ( <i>recA</i> Ident)
<i>Vibrio sp. TL002</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (88%)
<i>Vibrio sp. TL003</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (96%)
<i>Vibrio sp. TL006</i>	<i>Vibrio tasmaniensis</i> (99%)
<i>Vibrio sp. CF001</i>	<i>Vibrio cortegadensis</i> (98%)
<i>Vibrio sp. CF002</i>	<i>Vibrio hemicentroti</i> (97%)
<i>SUA-TP-A1</i>	<i>Vibrio splendidus</i> (96%)

Resultatene etter sekvenseringen av 16S rRNA-genet og *recA*-genet viser at de to sekvenseringsmetodene gir ulikt resultat av art hos nesten alle bakteriene. Bare *Vibrio sp. CF001* identifiseres som *V. cortegadensis* ved begge metodene. Denne bakterien tilhører ikke *V. splendidus* klade, slik som de andre artene listet opp i tabell 15 og 16.

### 5.3.3 Identifisering ved hjelp av MALDI-TOF MS

Det ble utført MALDI-TOF MS på bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001*, *CF002* og *SUA-TP-A1*, med den hensikt å artsbestemme isolatene. I tillegg ble det utviklet en MALDI-TOF MS database for de overnevnte isolatene, utenom *SUA-TP-A1*, for å studere hvilken stamme *SUA-TP-A1* tilhører og for å lettere kunne identifisere om ukjente bakterier er av samme art og stamme som en av de overnevnte isolatene.

#### 5.3.3.1 Identifisering med Bruker Daltonics MALDI-TOF MS database

Resultatene etter utført MALDI-TOF MS på bakterieisolatene, med benyttelse av Bruker Daltonics database for identifikasjon, er vist i tabell 17. De to kontrollene (*Vibrio anguillarum* LFI 317 og BTS – *E.coli*) som ble benyttet, ble identifisert som korrekt bakterieslekt og bakterieart. *Vibrio sp. TL003* og *-CF002* ble identifisert som sikker slekt *Vibrio* og trolig art *tasmaniensis*, *Vibrio sp. TL006* og *SUA-TP-A1* ble identifisert som trolig slekt *Vibrio* og mulig art *tasmaniensis*, mens *Vibrio sp. TL002* og *-CF002* ikke kunne identifiseres.

Tabell 17: Resultater fra MALDI-TOF MS. Identifikasjon av bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001*, *CF002* og *SUA-TP-A1*, etter utført MALDI-TOF MS med benyttelse av Bruker Daltonics database. Oppgitt score value er basert på hvor godt referansespekter i databasen samsvarer med prøvens spekter, og benyttet betydning av kalkulert score value er vist i tabell 7.

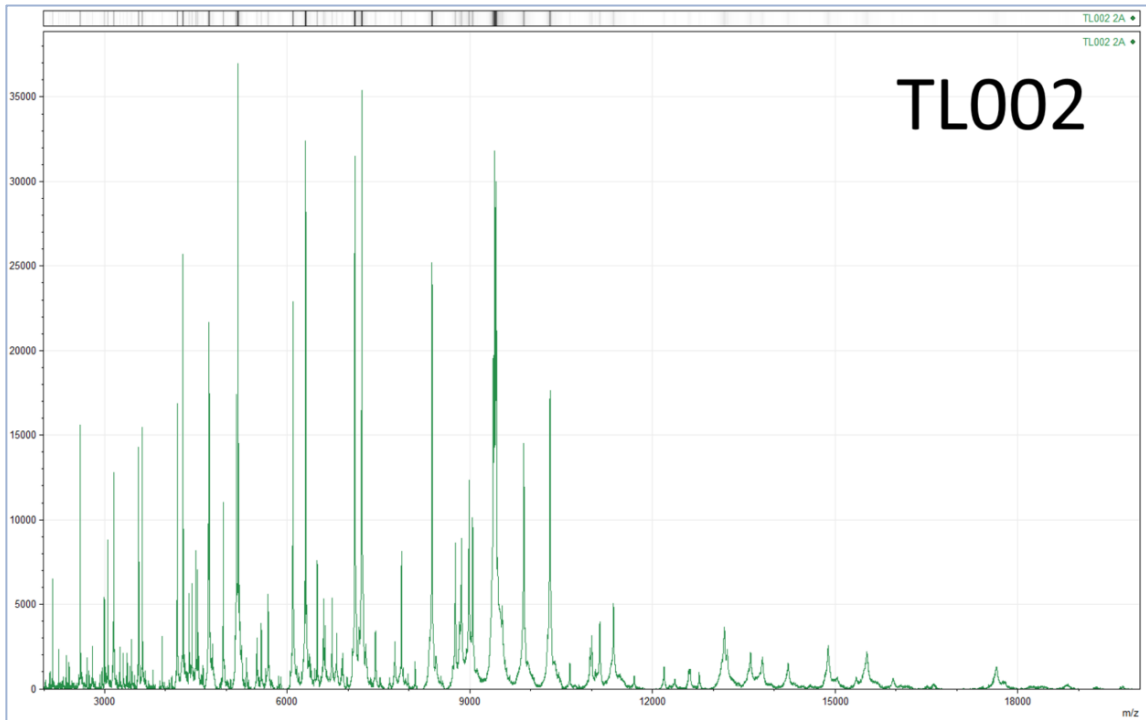
<b>Analyte Name</b>	<b>Analyte ID</b>	<b>Organism (best match)</b>	<b>Score Value</b>
A5	Vibrio anguillarum LFI 317	Vibrio anguillarum	2,392
A6	Vibrio CF002	Vibrio tasmaniensis	2,158
A7	Vibrio CF001	not reliable identification	1,298
A8	Vibrio TL002	not reliable identification	1,452
A9	Vibrio TL003	Vibrio tasmaniensis	2,016
A10	Vibrio TL006	Vibrio tasmaniensis	1,906
A11	Vibrio TP-A1	Vibrio tasmaniensis	1,818
A12	Vibrio TP-A1	Vibrio tasmaniensis	1,794
B1	BTS - E.coli	Escherichia coli	2,285

#### 5.3.3.2 Utvikling av MALDI-TOF MS database

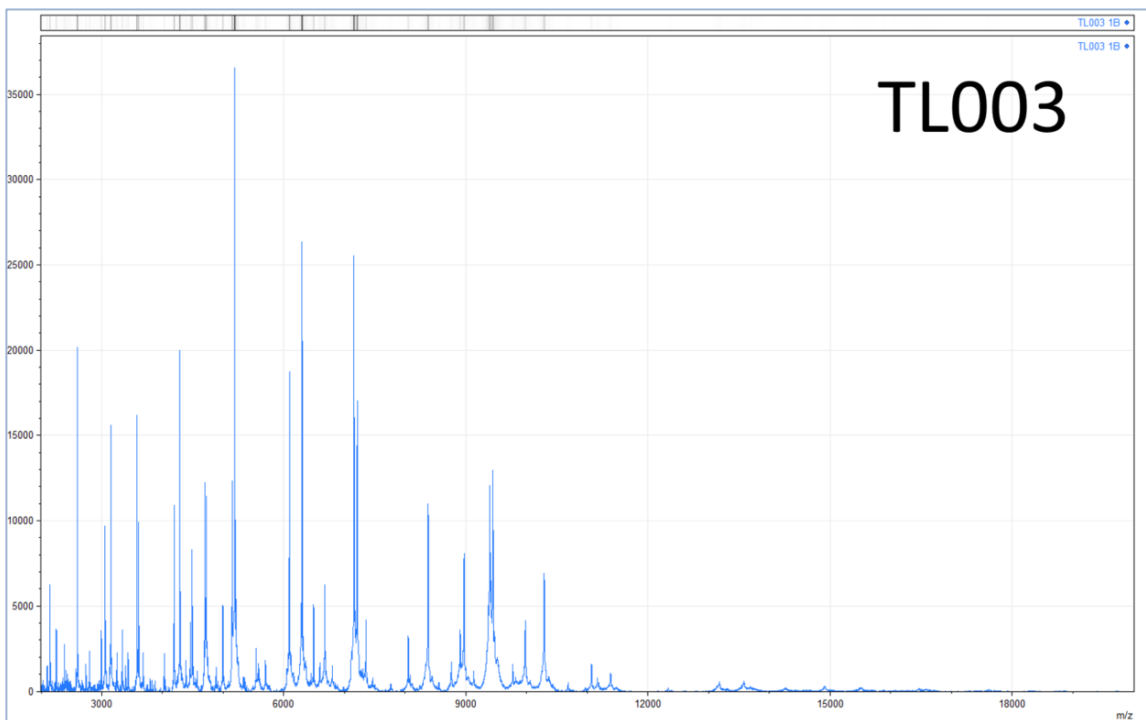
Det ble utviklet en MALDI-TOF MS database for bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001* og *-CF002*. For hver bakterie ble det utviklet totalt 25 referansespekter (5



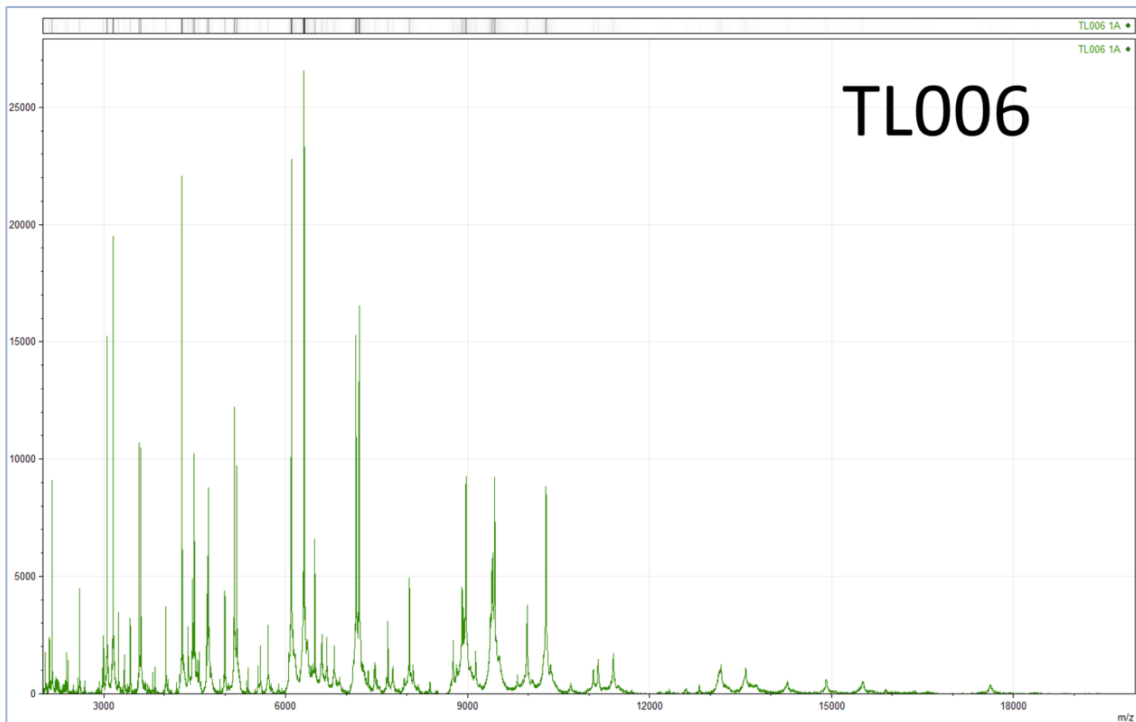
biologiske replikaer x 5 tekniske replikaer) til databasen, og en av disse referansespektrene for alle isolatene er vist i figurene nedenfor.



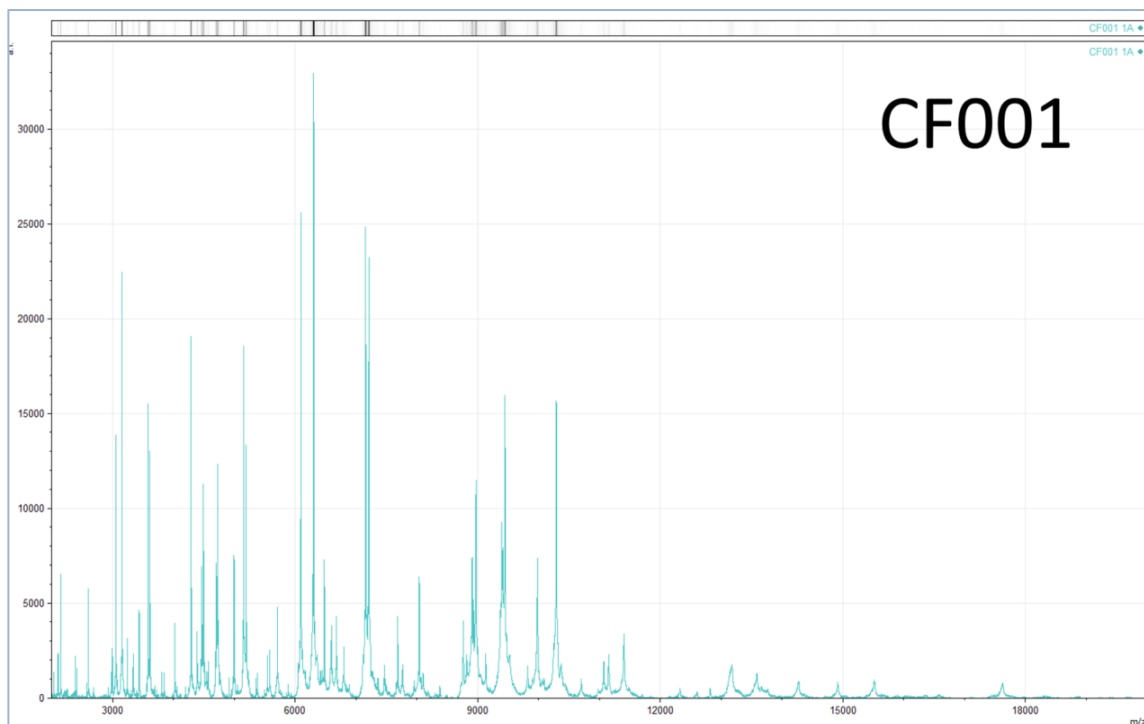
Figur 33: En av totalt 25 referansespekter som ble utviklet for *Vibrio sp. TL002*.



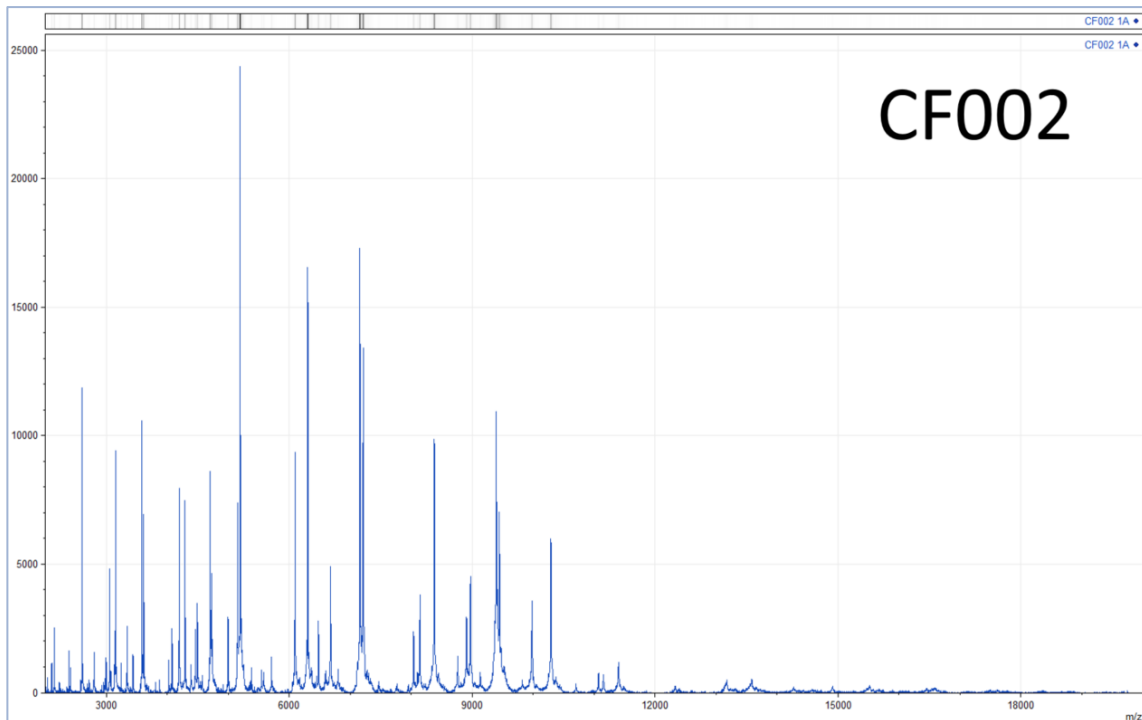
Figur 34: En av totalt 25 referansespekter som ble utviklet for *Vibrio sp. TL003*.



Figur 35: En av totalt 25 referansespekter som ble utviklet for *Vibrio sp. TL006*.



Figur 36: En av totalt 25 referansespekter som ble utviklet for *Vibrio sp. CF001*.



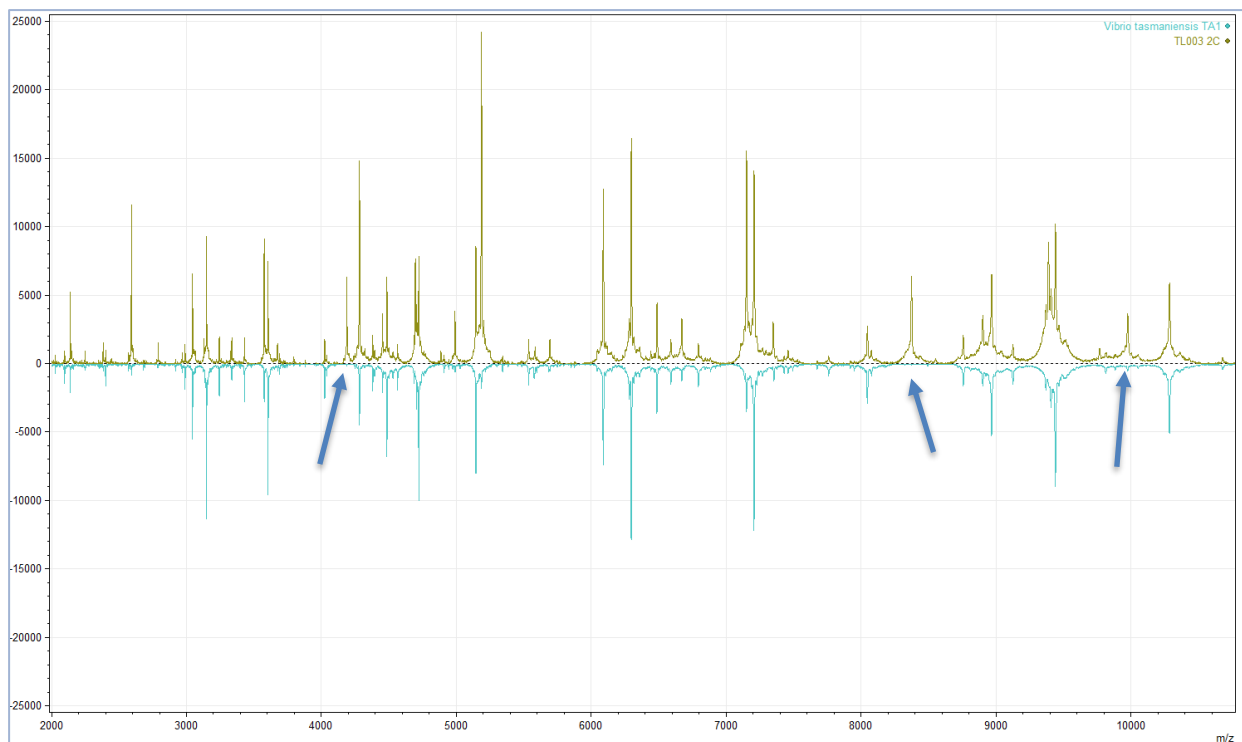
Figur 37: En av totalt 25 referansespekter som ble utviklet for *Vibrio sp. CF002*.

### 5.3.3.3 Identifisering med egenprodusert MALDI-TOF MS database

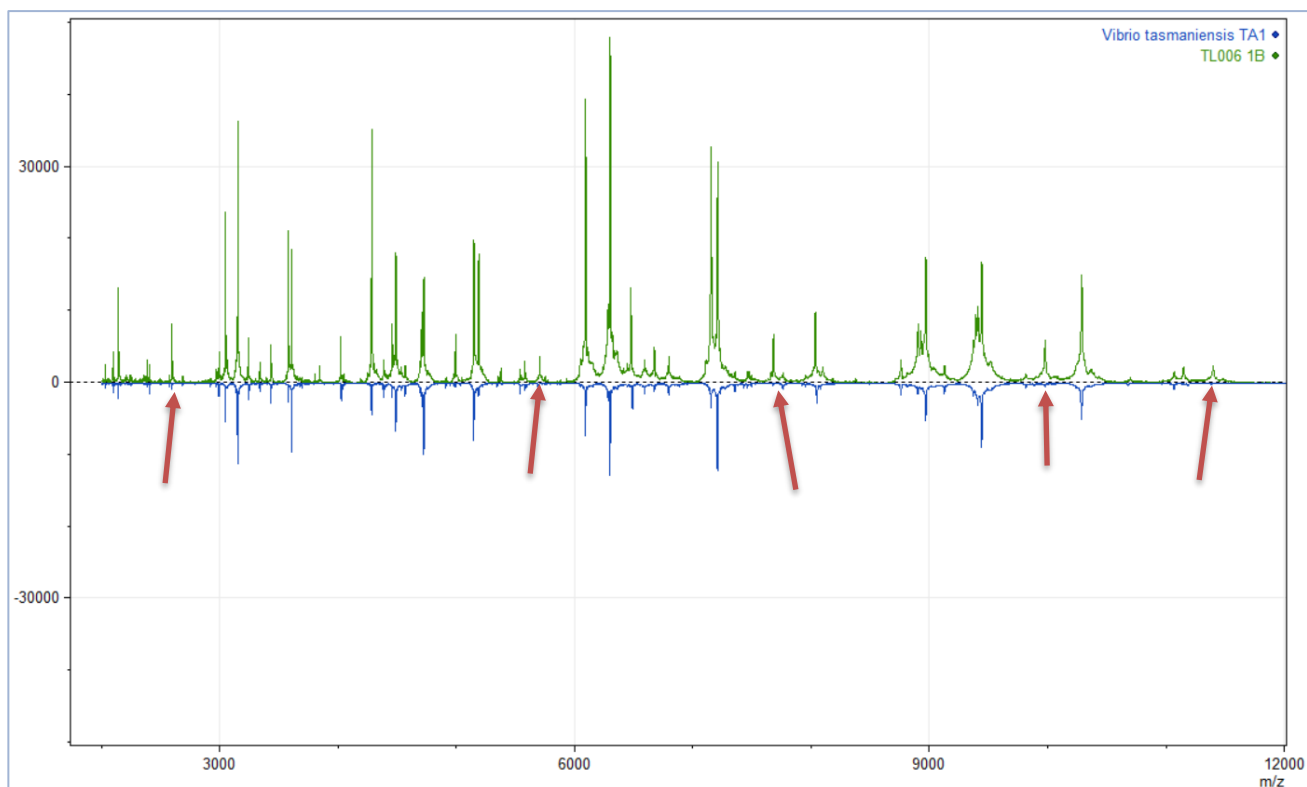
For å validere databasen og for å studere hvilken stamme *SUA-TP-A1* tilhører, ble bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001*, *CF002* og *SUA-TP-A1* identifisert med benyttelse av MALDI-TOF MS og egenprodusert database. Resultatene etter utført MALDI-TOF MS på bakterieisolatene er vist i tabell 18. Kontrollen (*Vibrio anguillarum* LFI 317) som ble benyttet ble identifisert som korrekt bakterieslekt og bakterieart, og bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001* og *-CF002* ble identifisert som korrekt stamme. To paralleller av bakterieisolaten *SUA-TP-A1* ble begge identifisert som bakteriestammen *Vibrio sp. TL003*. De resulterende spektrene til isolatene *SUA-TP-A1* og *Vibrio sp. TL003* ble derfor sammenlignet opp mot hverandre. En kunne se at de hadde svært like spekter, men med noen ulike topper (se figur 38). I tillegg ble spektrene til *SUA-TP-A1* og *Vibrio sp. TL006* sammenlignet opp mot hverandre, på grunn av at en etter utført smitteforsøk mistenkte at *SUA-TP-A1* var en re-isolat av *Vibrio sp. TL006*. Figur 39 viser at også disse to isolatene hadde svært like spekter. Likevel var det noen ulike topper mellom spektrene til disse to isolatene.

Tabell 18: Resultat av MALDI-TOF MS på marine bakterier. Identifikasjon av bakterieisolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001*, *CF002* og *SUA-TP-A1*, etter utført MALDI-TOF MS med benyttelse av egenprodusert database. Oppgitt score value er basert på hvor godt utviklet referansespekter i databasen samsvarte med prøvens spekter, og benyttet betydning av kalkulert score value er vist i tabell 7.

Analyte Name	Analyte ID	Organism (best match)	Score Value
A5	Vibrio anguillarum LFI 317	Vibrio anguillarum	2,483
A6	Vibrio CF002	Vibrio CF002 1c	2,638
A7	Vibrio CF001	Vibrio CF001 5a	2,493
A8	Vibrio TL002	Vibrio TL002 3a	2,623
A9	Vibrio TL003	Vibrio TL003 2b	2,887
A10	Vibrio TL006	Vibrio TL006 1d	2,643
A11	Vibrio TP-A1	Vibrio TL003 2d	2,481
A12	Vibrio TP-A1	Vibrio TL003 2c	2,462



Figur 38: Sammenligning av MALDI-TOF MS spektrene for *SUA-TP-A1* og *Vibrio sp. TL003*. Spektret til *SUA-TP-A1* er flippet opp ned. Kan se at spektrene er veldig like, men det er likevel noen topper som er ulike mellom spektrene (se blå piler for eksempler på ulike topper).



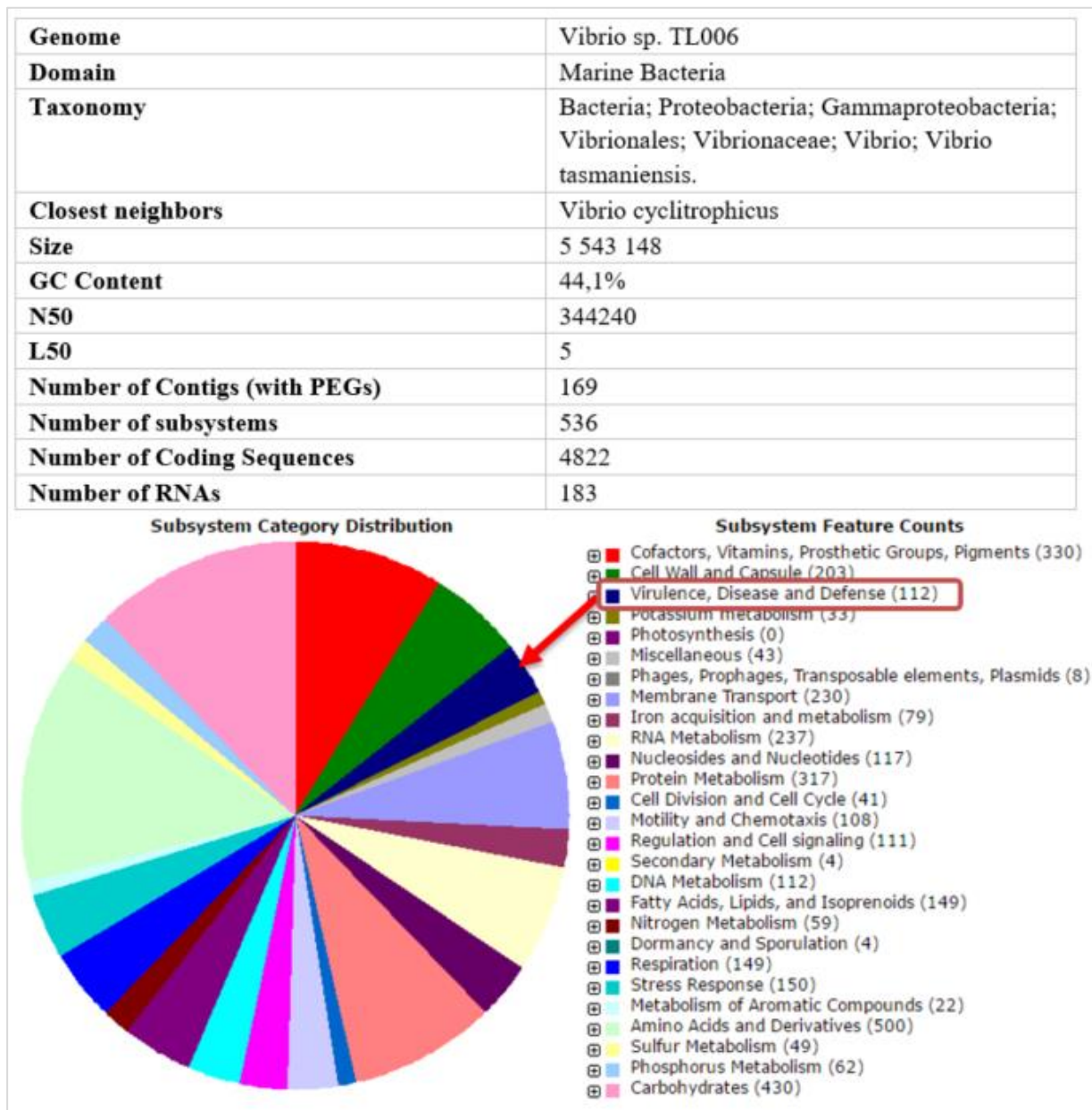
Figur 39: Sammenligning av MALDI-TOF MS spektrene for *SUA-TP-A1* og *Vibrio sp. TL006*. Spektret til *SUA-TP-A1* er flippet opp ned. Kan se at spektrene er veldig like, men det er likevel noen topper som er ulike mellom spektrene (se røde piler for eksempler på ulike topper).

#### 5.3.4 Karakterisering og identifisering ved hjelp av helgenomanalyse

For å artsbestemme stammene *Vibrio sp. TL006* og *-CF002*, samt identifisere enkelte virulensgener hos stammene, ble helgenomsekvensene til TL006 og CF002 benyttet. Resultatet overlevert av MicrobesNG etter utført helgenomanalyse viser at begge isolatene ble identifisert som arten *V. tasmaniensis* (se tabell 19). Resultater etter prosessering og sub-kategorisering av gener i programmet RAST og the Seed Viewer er vist i figur 40 for *TL006* og figur 41 for *CF002*. Ved BLAST-søk etter enkelte virulensgener ble *OmpU*-genet, *vsm*-genet, flagell-gener og hemolyse-gener funnet hos begge isolatene (se tabell 20).

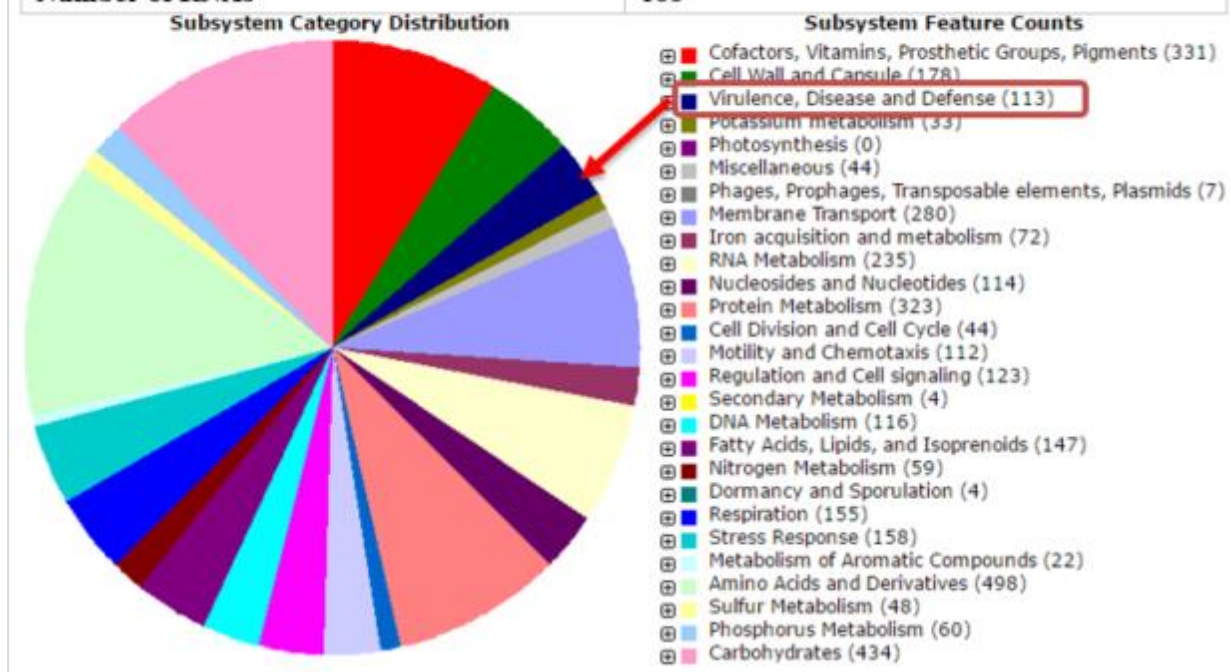
Tabell 19: Identifikasjonsresultat fått av MicrobesNG etter utført helgenomanalyse. Både *Vibrio sp. TL006* og *-CF002* ble identifisert som arten *V. tasmaniensis*.

Sample	Unclassified (%)	Most frequent Family (%)	Most frequent Family	Most frequent genus (%)	Most frequent genus	Most frequent species (%)	Most frequent species
<b><i>TL006</i></b>	34,01	65,06	<i>Vibrionaceae</i>	64,62	<i>Vibrio</i>	62,59	<i>V. tasmaniensis</i>
<b><i>CF002</i></b>	35,39	63,68	<i>Vibrionaceae</i>	63,16	<i>Vibrio</i>	60,77	<i>V. tasmaniensis</i>



Figur 40: Helgenomsekvensdata etter prosessering av nukleotidsekvensen til *TL006*. Genene er kategorisert i subsystem, og gener som koder for virulens, sykdom og forsvar er uthevet i rødt.

<b>Genome</b>	Vibrio sp. CF002
<b>Domain</b>	Marine Bacteria
<b>Taxonomy</b>	Bacteria; Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Vibrionales; Vibrionaceae; Vibrio; Vibrio tasmaniensis.
<b>Closest neighbors</b>	Vibrio cyclitrophicus
<b>Size</b>	5 655 029
<b>GC Content</b>	44,1%
<b>N50</b>	317388
<b>L50</b>	6
<b>Number of Contigs (with PEGs)</b>	162
<b>Number of subsystems</b>	539
<b>Number of Coding Sequences</b>	4993
<b>Number of RNAs</b>	188



Figur 41: Helgenomsekvensdata etter prosessering av nukleotidsekvensen til CF002. Genene er kategorisert i subsystem, og gener som koder for virulens, sykdom og forsvar er uthevet i rødt.

Tabell 20: Funn av virulensgenene OmpU og vsm, samt flagell- og hemolyse-gener. Begge isolatene har tilstedeværelse av disse genene (X er angitt for funn av gen).

<b>Virulensgen:</b>	<b>OmpU</b>	<b>vsm</b>	<b>Flagell</b>	<b>Hemolyse</b>
<b>Isolat:</b>				
<b>TL006</b>	X	X	X	X
<b>CF002</b>	X	X	X	X

## 6 Diskusjon

Den grønne kråkebollen, *S. droebachiensis*, synes å være utsatt for sykdom både i akvakulturnæringen og i naturen [10]. Likevel er ingen patogener for kråkeboller kjent i litteraturen, men rapporterte symptomer har gitt navn til flere ulike kråkebollesykdommer. Blant annet har symptomer som tap av pigger og sugeføtter, samt utvikling av mørke, glinsende lesjoner, gitt navn til kråkebollesykdommen «skallet kråkebollesyndrom», på engelsk kalt «bald sea urchin disease/spotting disease» [2, 48, 53]. En arbeidshypotese i forbindelse med et pågående doktorgradsprosjekt i forskningsgruppen Marin Bioprospektering ved NFH, er at bakteriearter innenfor *V. splendidus* klade kan assosieres med skallet kråkebollesyndrom hos *S. droebachiensis* [Hira, Stensvåg, Li, pers. komm]. Fokuset i denne oppgaven har dermed vært på marine *Vibrio*-bakterier fra både friske og syke *S. droebachiensis*. Det er blant annet forsøkt å påføre infeksjon hos friske kråkeboller ved et lite smitteforsøk. Med valgt oppsett for smitteforsøk, og med unntak av et individ, lyktes det ikke å verifisere hypotesen om at arter tilhørende *V. splendidus* klade kan assosieres med symptomer karakterisert som skallet kråkebollesyndrom hos *S. droebachiensis*. I denne oppgaven har det i tillegg vært viktig å ha fokus på identifisering av de marine bakteriene isolert fra *S. droebachiensis*. Det ble dermed utviklet en MALDI-TOF MS database for hurtig påvisning og karakterisering av enkelte *Vibrio*-bakterier. Dette ble sammenstilt med helgenomanlysedata.

### 6.1 Mikrobiotaen hos *S. droebachiensis*

Ved isolering og identifisering av *Vibrio*-lignende bakterier fra friske *S. droebachiensis*, ble det funnet *Vibrio*, *Photobacterium*, *Acinetobacter*, *Shewanella*, *Roseobacter*, *Agarivorans*, *Pseudomonas*, *Allivibrio*, *Moritella*, *Thalassomonas* og *Colwellia*. Bakteriene ble isolert fra TP, CF og PM, og dette indikerer at disse bakteriene er en del av den normale bakteriefloraen både i og på *S. droebachiensis*. Til sammenligning fant Unkles (1977) også *Vibrio*, *Pseudomonas* og *Acinetobacter* hos friske kråkeboller av arten *Echinus esculentus* [118], og Nelson et al. (2010) fant blant annet *Vibrio*, *Pseudomonas* og *Shewanella* hos friske kråkeboller av arten *Lytechinus variegatus* [119]. Likevel er flere av bakteriene isolert fra de friske *S. droebachiensis* klassifisert som patogen for enkelte andre marine virvelløse dyr. Blant annet konstaterte López et al. [120] at en *Pseudomonas*-art var patogen for kilesål, og Liu et al. [121] konstaterte at art tilhørende *V. splendidus* klade var patogen for Yasso kamskjell.



Blant de to *Vibrio*-bakteriene isolert fra friske *S. droebachiensis* i denne oppgaven, ble én av bakterieisolatene identifisert som art tilhørende *V. splendidus* klade. Siden samtlige arter tilhørende *V. splendidus* klade er allestedsnærværende i det marine miljø, var det derfor forventet å finne noen få *V. splendidus*-arter hos de friske kråkebollene [66]. Imidlertid ble kråkebollene definert som frisk om de ikke viste synlige symptomer på overflaten. Dermed kan en ikke utelukke at isolatet, identifisert som art tilhørende *V. splendidus* klade, stammer fra ett sykt individ uten synlige symptomer. Likevel ble det ikke funnet en dominerende tendens av bakteriearter tilhørende *V. splendidus* klade hos de visuelt friske kråkebollene, slik som rapportert hos kråkebollene med skallet kråkebollesyndrom i det pågående doktorgradsprosjekt til Hira [pers. komm]. Dermed var trolig individet, som *V. splendidus*-isolaten stammet fra, et friskt individ. På grunnlag av dette kan en ikke utelukke tilstedeværelse av art tilhørende *V. splendidus* klade hos friske *S. droebachiensis*. Imidlertid er det mulig at arter tilhørende *V. splendidus* klade er opportunistiske bakterier for *S. droebachiensis*, som vil si at de under normale forhold ikke forårsaker sykdom. Med andre ord kan en eller flere av artene være årsak til infeksjon om den normale bakteriekonsentrasjonen i miljøet økes, eller eventuelt om viktige komponenter i infeksjonsforsvaret til kråkebollen svikter.

## 6.2 Patogene *Vibrio*-stammer og smitteforsøk

For å studere om *S. droebachiensis* utvikler sykdomssymptomer ved smitte av bakterier tilhørende *V. splendidus* klade, ble det ved denne oppgaven utført et eksperimentelt, innledende smitteforsøk. Friske *S. droebachiensis* med/uten tilført sår ble eksponert for enten *Vibrio sp. TL006* eller *Vibrio sp. CF002*, isolert og identifisert som *V. splendidus*-arter ved det pågående doktorgradsprosjektet. Resultatene fra smitteforsøket viste at bare én av totalt 48 kråkeboller smittet med *TL006* eller *CF002* utviklet et distinkt sykdomssymptom (lesjon). Siden kråkebollene benyttet for smitteforsøk ble oppsamlet fra naturen, hadde en ingen forkunnskap om livshistorien til kråkebollene eller hva de tidligere var blitt utsatt for. Det er dermed en usikkerhet knyttet til hvorfor denne ene kråkebollen utviklet lesjon. En forklaring er at kråkebollen var mer utsatt for infeksjon enn de andre kråkebollene, på grunn av for eksempel svikt i immunforsvaret. En annen forklaring er at kråkebollen allerede før smitteforsøket var blitt smittet med en annen type agens enn art tilhørende *V. splendidus* klade. Imidlertid vokste det opp bare en type bakterie på agarskålen med tilført TP fra kråkebollen med lesjon, og denne bakterien ble identifisert, ved hjelp av 16S rRNA-sekvensering, som art tilhørende *V.*

*splendidus* klade. Etter avsluttet smitteforsøk mistenkte en derfor at bakterieisolatet fra kråkebollen med lesjon var en re-isolat av *Vibrio sp. TL006*. Hvis dette var tilfelle ville Kochs postulater være oppfylt, og dermed ville TL006-bakterieisolatet vært bevist å ha vært assosiert med sykdomstegn, eller vært patogen. Selv om dette ville være oppfylt, ville det statistiske grunnlaget for dette ikke være tilstede, da bare denne ene kråkebollen med lesjon ble detektert.

Selv om de fleste kråkebollene etter avsluttet smitteforsøk viste en generelt mørkere overflate med relativt færre pigger sammenlignet med kråkebollene fra kontrollgruppene, utviklet de ikke et karakteristisk, distinkt sykdomssymptom. Med andre ord var det ikke mulig å påvise at mikroorganismene var i stand til å fremkalle lesjon hos forsøksdyrene i løpet av den tiden smitteforsøket pågikk. Dermed synes ikke Kochs postulater å være oppfylt, da grunnlaget for å antyde at TL006 og/eller CF002 er patogener er for spinkelt. Likevel er dette smitteforsøket interessant, da det kan gi informasjon om kråkeboller og deres mikrobiota. En forklaring på få sykdomstegn er at disse kråkebollene hadde et godt immunforsvar som bekjempet infeksjonen, ved for eksempel å produsere AMPs. På bakgrunn av at det var lite eller ingen bakterievekst på flere agarskåler med råmateriale fra kråkebollene utsatt for smitteagens, styrkes denne påstanden. Dette fordi stor produksjon av AMPs sannsynligvis vil føre til liten tilstedeværelse av bakterier generelt [122]. I tillegg er det tenkelig at kråkebollene ble syke på en slik måte at symptomer ikke var godt synlige og dermed vanskelig å få øye på. Det er derfor mulig at kråkebollene ville utviklet lesjoner på overflaten om smitteforsøket hadde pågått over lengre tid.

Parametere som for eksempel bakteriekonsentrasjon, eksponeringstid, vannsirkulasjon, temperatur og smittemetode, er også faktorer som kan ha påvirket sykdomsutviklingen og lesjonsdannelsen hos kråkebollene. I denne oppgaven ble det valgt «badsmitte», da en ønsket å tilsette bakteriene mest mulig skånsomt, samt å så nær som mulig imitere en «naturlig» smitteprosess. Det finnes få eksempler på smitteforsøk med kråkeboller i litteraturen, men et eksempel med badsmitte er studien til Tajima et al. [123]. De utførte smitteforsøk på arten *S. intermedius* ved 20 °C, 23 °C og 25 °C, der de utsatte kråkebollen for 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup> og 10<sup>6</sup> cfu/ml av et isolat tilhørende familien *Cytophagaceae*. Etter 10 dager var ingen av kråkebollene utsatt for smitte ved 20 °C død, men alle kråkebollene utsatt for smitte ved 25 °C døde etter 3 dager. De kråkebollene utsatt for 10<sup>6</sup> cfu/ml ved 25 °C døde innen 24 timer etter smitte. Med andre ord kunne Tajima et al. rapportere at temperatur og bakteriekonsentrasjon hadde innvirkning på sykdom og deretter død hos kråke-bollearten *S. intermedius*. Denne konklusjonen kan

sammensettes med studien til Hernroth [124], hvor påvirkningen av temperatur og LPS-dose for produksjon av AMPs i muslingen *Mytilus edulis* ble studert. Hernroth konkluderte med at produksjonen av AMPs økte raskere ved høyere temperaturer og større doser enn ved lave temperaturer og små doser. Dette kan dermed bety at en organisme får en raskere og større infeksjon om dosen med smitteagens er stor og temperaturen i miljøet er høy. I smitteforsøket ved denne oppgaven ble *S. droebachiensis* utsatt for en dose på ca.  $10^6$ - $10^7$  cfu/ml ved ca. 12 °C. Dermed ble *S. droebachiensis* utsatt for en relativt stor dose smitteagens, men ved en lav temperatur, sammenlignet med Tajima et al. sitt smitteforsøk på *S. intermedius* [123]. Temperaturen ved smitteforsøket var derfor mulig ikke høy nok for å gi en større infeksjon hos *S. droebachiensis*. Likevel var opprinnelsen til kråkebollene med lesjoner, som TL006 og CF002 var isolert fra, fra et oppdrettsanlegg hvor temperaturen var lik den arktiske havtemperaturen (4 - 12 °C) [Stensvåg pers. komm]. Dette vil si at kråkebollene i smitteforsøket ble utsatt for smitteagens ved en tilnærmet «naturlig» temperatur for arten *S. droebachiensis*.

Et annet eksempel på et smitteforsøk utført på kråkeboller er studien til Bauer og Young [49]. I denne studien ble kråkebollearten *P. cristatus* injisert med bakteriesuspensjon istedenfor eksponering ved «badsmitte», slik som kråkebollene i denne oppgaven. Resultatene deres etter utført smitteforsøk indikerte at bakterien *V. alginolyticus* forårsaket sykdomssymptom og deretter død, men da bare ved en massiv coelominfeksjon. Imidlertid ble smitteforsøket utført uten vannsirkulasjon/vannutskiftning, samt med svært få individer i hver gruppe (4 stk.). I tillegg ble det ikke utført LD50-testing, som vil si at studien ikke hadde gode betingelser for å si noe om hvor stort smittepress som behøvdes for å gi 50% dødelighet. Likevel ga den grunnlag for spørsmål om coelomvæsken til *S. droebachiensis* også må inneholde en relativt stor bakteriekonsentrasjon av TL006 eller CF002 for at kråkebollene skal utvikle karakteristiske lesjoner. Ved et reelt, nytt smitteforsøk kan en derfor vurdere om kråkebollene skal injiseres med bakteriesuspensjon, med tanke på direkte smitte med stor bakteriedose. Eventuelt kan en vurdere om bakteriekonsentrasjon og eksponeringstid skal økes ved badsmitte. Det mest ønskelige bør være å velge parametere som ligner et naturlig miljø, for å kunne konstatere at en art tilhørende *V. splendidus* klade er patogen for *S. droebachiensis*. I tillegg trengs gruppeparalleller med relativt mange individer, for å utføre gode statistiske tester som kan påvise signifikans mellom kontrollindividene og smittede individer, samt sikre at resultatet i smitteforsøket kan verifiseres i flere forsøk slik at det holder standard for vitenskapelig arbeid.

For å konkludere kan en ut ifra det eksperimentelle smitteforsøket som ble foretatt i denne oppgaven ikke bekrefte eller utelukke at *Vibrio sp. TL006* eller *-CF002* er patogen for kråkebollearten *S. droebachiensis*. Dermed kan ikke hypotesen, om at bakteriearter tilhørende *V. splendidus* klade kan assosieres med symptomer karakterisert som skallet kråkebolle-syndrom hos arten *S. droebachiensis*, verifiseres. Et nytt smitteforsøk med endrede betingelser må derfor utføres for å kunne verifisere eller forkaste hypotesen. Endringene bør ha fokus på et større smittepress eller endring av betingelser for inkubasjon.

### 6.3 Metodikk for identifikasjon og karakterisering av *Vibrio*-stammer

Identifiseringen av bakteriene isolert fra de visuelt friske, grønne kråkebollene og kråkebollene som deltok i smitteforsøket, ble utført ved hjelp av sekvensering av 16S rRNA-genet til bakteriene. Til sammen ble det identifisert 57 isolater, der 7 var *Vibrio*-bakterier. Blant annet fordi 16S rRNA-sekvensering er en relativt kostbar og tidkrevende metode, ble bare dyrkbare bakterier med lignende morfologi som *Vibrio sp.* selektert ut for isolering og identifisering. Dette vil si at blant mange bakterier funnet hos *S. droebachiensis*, ble bare noen få bakterier identifisert. På den ene siden var det akseptabelt å selektere ut enkelte bakterier, da *Vibrio*-bakterier var fokus og en målrettet var ute etter å finne arter tilhørende *V. splendidus* klade. På den andre siden kunne dette medføre større sannsynlighet for tap av funn av noen *Vibrio sp.*, samt at en ikke fikk hele oversikten over mikrobiotaen hos *S. droebachiensis*. I tillegg viste 16S rRNA-sekvenseringen seg uegnet til å verifisere om isolatene isolert fra de friske, grønne kråkebollene og kråkebollene som deltok i smitteforsøket var av samme art eller stamme som isolatene isolert fra syke *S. droebachiensis* ved pågående doktorgradsprosjekt. Like fullt kunne ikke metoden konkret identifisere og skille isolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001*, og *-CF002*, isolert fra syke *S. droebachiensis* ved pågående doktorgradsprosjekt. Grunnen til dette er at samtlige av bakterieisolatenes 16S rRNA-gen viser stor sekvenslikhet med 16S rRNA-genet hos flere ulike arter fra *V. splendidus* klade i NCBI-databasen.

Problemet med identifisering og klassifisering av arter tilhørende *V. splendidus* klade er også rapportert om i studien til Pérez-Cataluña et al. [65]. I denne studien identifiserte de arter tilhørende *V. splendidus* klade, både ved hjelp av sekvensering av 16S rRNA-, *recA*-, *gyrB*-, *mreB*-, *rpoD*- og *pyrH*-genet. Resultatene deres etter utført studie viste at sekvensering av flere ulike genetiske markører kan benyttes for å artsbestemme bakterier innenfor *V. splendidus* kladen. Likevel evaluerte de tilnærmingen som dårlig for identifikasjon av enkelte arter, da de

for eksempel hadde problemer med å identifisere og klassifisere artene *V. tasmaniensis* og *V. atlanticus* [65]. I denne oppgaven ble det utført sekvensering av de genetiske markørene 16S rRNA og *recA* på isolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001* og *-CF002*, samt på isolatet *SUA-TP-A1* fra kråkeballen med lesjon etter utført smitteforsøk. Resultatene fra sekvenseringen ga, til forskjell i fra sekvensering med mange genetiske markører, svært dårlig indikasjon på hvilken *Vibrio*-art isolatene tilhørte. Dette var forventet, da det er kjent i litteraturen at det er stor sekvenslikheten i flere genetiske markører, som for eksempel 16S rRNA og *recA*, mellom flere av artene i slekten *Vibrio* [91, 92, 94].

Siden sekvensering av genetiske markører for identifikasjon av dyrkbare marine bakterier viste seg å være en svært tidkrevende og kostbar metode, i tillegg til at den ikke var optimal for å identifisere enkelte bakterier på artsnivå, ble det ved denne oppgaven vurdert andre metoder for identifikasjon. Da det er rapportert at MALDI-TOF MS er en enkel, hurtig og lite kostbar metode som kan identifisere bakterier ned på både art- og stammenivå, ble metoden ansett som en mulig metode for identifikasjon av *Vibrio*-stammer fra *S. droebachiensis* [110, 112]. Ved analysing av isolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001*, *-CF002* og *SUA-TP-A1*, med bruk av den kommersielle databasen til Bruker Daltonics for identifikasjon, ble isolatene *TL003* og *CF002* identifisert som *V. tasmaniensis* og isolatene *TL006* og *SUA-TP-A1* ble identifisert som mulig arten *V. tasmaniensis*. Isolatene *TL002* og *CF001* kunne derimot ikke identifiseres. Med andre ord hadde denne kommersielle databasen en begrensning i forhold til innhold av referansespekter fra marine bakterier. Dette er også rapportert om av Emami et al. [114], hvor de benyttet MALDI-TOF MS for identifikasjon av marine bakterier i ballastvann. De konkluderte med at metoden hadde problemer med å identifisere spesielt *Vibrio*-bakterier på artsnivå. Ved denne oppgaven ble det derfor utviklet en egen database for marine bakterier med innhold av referansespekter fra isolatene *Vibrio sp. TL002*, *-TL003*, *-TL006*, *-CF001* og *-CF002*.

Begrunnelsen for å utvikle en MALDI-TOF MS database for *Vibrio*-isolatene isolert ved det pågående doktorgradsprosjektet, var at en med bruk av den lettere kunne identifisere eller si om ukjente bakterier er av samme art og stamme som en av isolatene i databasen. Ved et smitteforsøk vil dette være nyttig, da en enkelt kan få informasjon om en har re-isolert et bestemt isolat. Ved denne oppgaven ble isolatet *SUA-TP-A1*, isolert fra kråkeballen med lesjon fra eksperimentelt, innledende smitteforsøk, analysert med benyttelse av egenprodusert database. Dette for å studere om *SUA-TP-A1* var en re-isolat av *TL006*, slik som en mistenkte

etter utført smitteforsøk. Analyseresultatene etter utført MALDI-TOF MS viste derimot at *SUA-TP-A1* ble identifisert som TL003. Imidlertid er det mulig at både *SUA-TP-A1*, TL003 og TL006 er svært lik i utgangspunktet, da det ble vist at de alle tre har svært lik morfologi, sekvenslikhet av genetiske markører og like spekter. Begrunnelsen for at de ikke har identiske spekter, kan være at intensiteten på toppene til en prøve kan variere noe for hver gang prøven analyseres. Dette ble for eksempel sett ved referansebakterienes biologiske og tekniske spekterreplikaer i databasen. Videre undersøkelse av isolatene bør likevel foretas for å studere om de faktisk er av «samme stamme».

I helt nyere tid har Machado et al. [125] oppdaget en genetisk markør kalt «fur». Dette genet koder for regulering av jernopptak hos bakterier, og Machado påstår at dette genet alene kan benyttes for å identifisere bakterier fra familien *Vibrionaceae* på artsnivå. Dermed kan *fur*-sekvensering, eventuelt i kombinasjon med MALDI-TOF MS, i fremtiden være et alternativ for identifikasjon av arter tilhørende *V. splendidus* klade isolert fra friske og syke *S. droebachiensis*. Sammenlignet med MALDI-TOF MS, er likevel gensekvensering per i dag en mer tidkrevende og kostbar analysemetode for identifikasjon av bakterier, men tilnærmingen kan i noen tilfeller gi mer informasjon om bakterien. Ved helgenomsekvensering for eksempel får en informasjon om hele genomet til en bakterie, og dermed også gener som koder for proteinsammensetningen i en bakterie [103].

Ved denne oppgaven ble helgenomsekvensene til bakterieisolatene *Vibrio sp. TL006* og *-CF002* benyttet. Sekvensene ble benyttet både for å gi identifikasjon av art, samt til å identifisere enkelte virulensgener hos stammene. Resultatene viste at begge isolatene ble identifisert som arten *V. tasmaniensis*. Dette samsvarer med resultatet fått ved analysering på MALDI-TOF-MS. Arten er av blant andre Pérez-Cataluña et al. [65] og Machado et al. [125] rapportert om som en art som svært ofte blir identifisert som arten *V. splendidus*. Imidlertid gir nukleotidsekvensen av hele genomet nok informasjon til korrekt identifikasjon av art, i tillegg til informasjon om virulensgener. Virulensgenene *OmpU* og *vsm* ble blant annet identifisert hos både *Vibrio sp. TL006*, og *-CF002*. *OmpU*-proteinet er rapportert å utgjøre en stor virulensfaktor blant *Vibrio*-stammer, og da særlig blant *V. splendidus*-relaterte arter [126]. I tillegg er det vist at proteinet spiller en aktiv rolle i vert-patogen-interaksjoner, tjener som adhesjonsprotein [127], og er involvert i resistansen mot antimikrobielle peptider [128]. Metalloproteasen *vsm* er rapportert som den viktigste toksiske faktoren i ekstracellulære produkter hos enkelte arter tilhørende *V. splendidus* klade [129]. Genet for dette proteinet, samt

flagell- og hemolyse-gener, ble også identifisert blant genomene til isolatene. Gener som koder for flagell og hemolytisk aktivitet var forventet å finne, da resultater fra hemolyse-test og SEM viste at isolatene var  $\beta$ -hemolytisk og hadde flagell.

Funn av virulensgener som koder for OmpU, vsm, flagell og hemolytisk aktivitet hos isolatene *TL006* og *CF002*, kan være med å styrke påstanden om at disse stammene er patogen for *S. droebachiensis*. Likevel bør videre analyse av flere virulensgener i genomet til isolatene utføres. I tillegg bør det dokumenteres hvilken effekt virulensfaktorene har hos kråkeboller, før en eventuelt kan konkludere om disse to stammene er patogen for *S. droebachiensis*.

## 7 Konklusjon

- ❖ Undersøkelser i denne oppgaven viser at i mikrobiotaen hos både friske, grønne kråkeboller (*S. droebachiensis*) og kråkebolleindivid med symptomer på skallet kråkebolle-syndrom, inneholder bakterier tilhørende *V. splendidus* klade.
- ❖ Et eksperimentelt, lite smitteforsøk gav oppvekst av én bakterietype hos ett individ med lesjon i de eksperimentelle gruppene. Dette resultatet kan ikke benyttes til å verifisere om isolatene isolert fra syke individ, og som var benyttet i smitteforsøket, var patogen for den grønne kråkebollen.
- ❖ En rekke dyrkbare bakterier, også *Vibrio*-bakterier, ble isolert fra syke kråkeboller. PCR teknologi og sekvensering av 16S rRNA- og *recA*-gener kunne ikke skille disse *Vibrio*-bakteriene fra hverandre og peke på noen oppdyrkede *Vibrio*-stammer som mer patogen enn andre.
- ❖ En MALDI-TOF MS database for marine *Vibrio*-bakterier ble etablert, og gjorde det mulig på kort tid å analysere og identifisere likhet for oppdyrkede *Vibrio*-lignende kolonier med dem i databasen.
- ❖ Helgenomsekvensdata på to av de *V. splendidus*-relaterte-isolatene isolert fra syke kråkeboller, ble identifisert som bakteriearten *V. tasmaniensis*. I tillegg ble gener som koder for virulensfaktorer som OmpU, vsm, flagell og hemolytisk aktivitet påvist hos disse bakterie-isolatene.
- ❖ Analyser basert på gensekvenser, som 16S rRNA, er for upålitelig for å identifisere bakterier tilhørende *V. splendidus* klade, mens nøyaktige helgenomanalyser er for dyre og tidkrevende. Bruk av MALDI-TOF MS på marine bakterier vil være hurtig og billig, men krever en godt etablert database.
- ❖ Arbeidshypotesen om at bakteriearter innenfor *V. splendidus*- klade kan assosieres med symptomer som karakteriseres som skallet kråkebollesyndrom hos arten *S. droebachiensis*, kan ikke verifiseres ved denne oppgaven. Nye smitteforsøk med endrede betingelser må foretas for å kunne trekke en klar konklusjon på hypotesen.



## 8 Litteraturliste

1. Bondad-Reantaso, M.G., R.P. Subasinghe, J.R. Arthur, K. Ogawa, S. Chinabut, R. Adlard, Z. Tan, and M. Shariff, *Disease and health management in Asian aquaculture*. Veterinary Parasitology, 2005. **132**(3-4): p. 249-272.
2. Wang, Y., N. Feng, Q. Li, J. Ding, Y. Zhan, and Y. Chang, *Isolation and characterization of bacteria associated with a syndrome disease of sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* in North China*. Aquaculture Research, 2013. **44**(5): p. 691-700.
3. Plant, K.P. and S.E. LaPatra, *Advances in fish vaccine delivery*. Developmental & Comparative Immunology, 2011. **35**(12): p. 1256-1262.
4. Fiskedirektoratet, *Laks, regnbueørret og ørret - matfiskproduksjon*, Akvakultur, Editor. 2016.
5. Gudding, R., A. Lillehaug, and O. Evensen, *Fish Vaccination*. 2014, Hoboken: Wiley.
6. Evans, A.S., *Causation and Disease: The Henle-Koch Postulates Revisited 1*. The Yale Journal of Biology and Medicine, 1976. **49**(2): p. 175-195.
7. Olsen, A.B., T. Birkbeck, H. Nilsen, H. Macpherson, C. Wang, C. Myklebust, L. Laidler, L. Aarflot, E. Thoen, S. Nygaard, D. Colquhoun, and A.B. Olsen, *Vaccine-associated systemic *Rhodococcus erythropolis* infection in farmed Atlantic salmon *Salmo salar**. Diseases of Aquatic Organisms, 2006. **72**(1): p. 9-17.
8. Pedersen, G., *Kråkebolle-eventyr ble mareritt for Karen (30): - Tøft å høre så mye negativt*, in *Nettavisen*. 2015.
9. Walker, C.W., M.P. Lesser, and T. Unuma, *Chapter 3 - Sea Urchin Gametogenesis – Structural, Functional and Molecular/Genomic Biology*, in *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, M.L. John, Editor. 2013, Elsevier. p. 25-43.
10. Wang, Y.N., Y.Q. Chang, and J.M. Lawrence, *Chapter 12 - Disease in Sea Urchins*, in *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, M.L. John, Editor. 2013, Elsevier. p. 179-186.
11. Kroh, A. and A.B. Smith, *The phylogeny and classification of post-Palaeozoic echinoids*. Journal of Systematic Palaeontology, 2010. **8**(2): p. 147-212.
12. Baumiller, T., *Crinoid ecological morphology*, in *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* 2008. p. 221-249.
13. Yukio Yokota, Valeria Matranga, and Z. Smolenicka, *The sea urchin: From basic biology to aquaculture*. 2000, The Netherlands: A.A. Balkema Publishers, a member of Swets & Zeitlinger Publishers.
14. Keesing, J.K. and K.C. Hall, *Review of harvests and status of world sea urchin fisheries points to opportunities for aquaculture*. 1998. p. 1597-1604.
15. Johnstone, C.R., *Investigation of coelomic fluid from the sea urchin *E. chloroticus**. 2013, University of Otago: New Zealand. p. 166.
16. Sten Ivar Siikavuopio, Trine Dale, and A. Mortensen, *Oppdrett av kråkebolle - veiledning for oppdrettere*. 2009, Nofima: Tromsø. p. 21.
17. Al-Sharif, W., J. Sunyer, J. Lambris, L. Smith, and L. Smith, *Sea urchin coelomocytes specifically express a homologue of the complement component C3*. Journal of Immunology, 1998. **160**(6): p. 2983-2997.
18. Smith, L., C.S. Shih, S. Dachsenhausen, and S. Dachsenhausen, *Coelomocytes Express SpBf, a Homologue of Factor B, the Second Component in the Sea Urchin Complement System*. Journal of Immunology, 1998. **161**(12): p. 6784-6793.

19. Nair, S., H. Del Valle, P. Gross, D. Terwilliger, L. Smith, and S. Nair, *Macroarray analysis of coelomocyte gene expression in response to LPS in the sea urchin. Identification of unexpected immune diversity in an invertebrate*. *Physiological Genomics*, 2005. **22**(1): p. 33-47.
20. Pancer, Z., J.P. Rast, and E.H. Davidson, *Origins of immunity: transcription factors and homologues of effector genes of the vertebrate immune system expressed in sea urchin coelomocytes*. *Immunogenetics*, 1999. **49**(9): p. 773-786.
21. Rast, J.P., L.C. Smith, M. Loza-Coll, T. Hibino, and G. Litman, *Review - Genomic insights into the immune system of the sea urchin*, in *Science*. 2006. p. 952-956.
22. Johnson, P.T., *The coelomic elements of sea urchins ( Strongylocentrotus ) III. In vitro reaction to bacteria*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1969. **13**(1): p. 42,IN1,55-54,IN1,62.
23. Bertheussen, K. and R. Seljelid, *Echinoid phagocytes in vitro*. *Experimental Cell Research*, 1978. **111**(2): p. 401-412.
24. Edds, K.T., *Cell Biology of Echinoid Coelomocytes: I. Diversity and Characterization of Cell Types: I. Diversity and Characterization of Cell Types*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1993. **61**(2): p. 173-178.
25. Gross, P.S., L.A. Clow, and L.C. Smith, *SpC3, the complement homologue from the purple sea urchin, Strongylocentrotus purpuratus , is expressed in two subpopulations of the phagocytic coelomocytes*. *Immunogenetics*, 2000. **51**(12): p. 1034-1044.
26. Matranga, V., A. Pinsino, M. Celi, A. Natoli, R. Bonaventura, H.C. Schröder, and W.E.G. Müller, *Monitoring Chemical and Physical Stress Using Sea Urchin Immune Cells*, in *Echinodermata*, V. Matranga, Editor. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 85-110.
27. Hibino, T., M. Loza-Coll, C. Messier, A.J. Majeske, A.H. Cohen, D.P. Terwilliger, K.M. Buckley, V. Brockton, S.V. Nair, K. Berney, S.D. Fugmann, M.K. Anderson, Z. Pancer, R.A. Cameron, L.C. Smith, and J.P. Rast, *The immune gene repertoire encoded in the purple sea urchin genome*. *Developmental Biology*, 2006. **300**(1): p. 349-365.
28. Li, C., T. Haug, O.B. Styrvold, T.Ø. Jørgensen, and K. Stensvåg, *Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin, Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2008. **32**(12): p. 1430-1440.
29. Li, C., T. Haug, M.K. Moe, O.B. Styrvold, and K. Stensvåg, *Centrocins: Isolation and characterization of novel dimeric antimicrobial peptides from the green sea urchin, Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2010. **34**(9): p. 959-968.
30. Sivertsen, K., f. Norges, and T. Universitetet i, *Dynamics of sea urchins and kelp during overgrazing of kelp forests along the Norwegian coast*. 1997, Norges fiskerihøgskole: Tromsø.
31. Mortensen, T., *A monograph of the Echinoidea : 3:2, atlas : Camarodonta, 1 : Orthopsidæ, Glyphocyphidæ, Temnopleuridæ and Toxopneustidæ*. Vol. 3:2, atlas. 1943, Copenhagen: Reitzel.
32. Jensen, M., *The Strongylocentrotidae (Echinoidea), a morphologic and systematic study*. *Sarsia*, 1974. **57**(1): p. 113-148.

33. Scheibling, R.E. and B.G. Hatcher, *Chapter 18 Ecology of Strongylocentrotus droebachiensis*. *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, 2007. **37**: p. 353-392.
34. Percy, J.A., *Thermal Adaptation in the Boreo-Arctic Echinoid, Strongylocentrotus droebachiensis (O. F. Müller, 1776). I. Seasonal Acclimatization of Respiration*. *Physiological Zoology*, 1972. **45**(4): p. 277-289.
35. Stephens, R.E., *Studies on the development of the sea urchin Strongylocentrotus droebachiensis. I. Ecology and normal development*. *The Biological Bulletin*, 1972. **142**(1): p. 132-144.
36. Lang, C. and K. Mann, *Changes in sea urchin populations after the destruction of kelp beds*. *International Journal on Life in Oceans and Coastal Waters*, 1976. **36**(4): p. 321-326.
37. Himmelman, J. and J. Himmelman, *Population biology of green sea urchins on rocky barrens*. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 1986. **33**(3): p. 295-306.
38. Munk, J. and J.E. Munk, *Reproduction and growth of green urchins Strongylocentrotus droebachiensis (Mueller) near Kodiak, Alaska*. *Journal of Shellfish Research*, 1992. **11**(2): p. 245-254.
39. Himmelman, J.H. and H. Nédélec, *Urchin Foraging and Algal Survival Strategies in Intensely Grazed Communities in Eastern Canada*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1990. **47**(5): p. 1011-1026.
40. Keats, D.W., D.H. Steele, and G.R. South, *Depth-dependent reproductive output of the green sea urchin, Strongylocentrotus droebachiensis (O.F. Müller), in relation to the nature and availability of food*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 1984. **80**(1): p. 77-91.
41. Scheibling, R.E. and B.G. Hatcher, *Chapter 26 - Strongylocentrotus droebachiensis*, in *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, M.L. John, Editor. 2013, Elsevier. p. 381-412.
42. Sivertsen, K., T. Dale, and S.I. Siikavuopio, *Trap catch of green sea urchins Strongylocentrotus droebachiensis in kelp beds and barren grounds on the Norwegian coast*. *Journal of Shellfish Research*, 2008. **27**(5): p. 1271.
43. Lessios, H.A., P.W. Glynn, and D.R. Robertson, *Mass mortalities of coral reef organisms*. *Science (New York, N.Y.)*, 1983. **222**(4625): p. 715.
44. Lessios, H.A., D.R. Robertson, and J.D. Cubit, *Spread of Diadema Mass Mortality through the Caribbean*. *Science*, 1984. **226**(4672): p. 335-337.
45. Scheibling, R. and R. Stephenson, *Mass mortality of Strongylocentrotus droebachiensis (Echinodermata: Echinoidea) off Nova Scotia, Canada*. *International Journal on Life in Oceans and Coastal Waters*, 1984. **78**(2): p. 153-164.
46. Scheibling, R.E. and A.W. Hennigar, *Recurrent outbreaks of disease in sea urchins Strongylocentrotus droebachiensis in Nova Scotia: Evidence for a link with large-scale meteorologic and oceanographic events*. *Marine Ecology Progress Series*, 1997. **152**(1-3): p. 155-165.
47. Jangoux, M., *Diseases of Echinodermata. I. Agents microorganisms and protistans*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1986. **2**: p. 147-162.
48. Gilles, K., J. Pearse, and K. Gilles, *Disease in sea urchins Strongylocentrotus purpuratus : Experimental infection and bacterial virulence*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 1986. **1**(2): p. 105-114.

49. Bauer, J.C. and C.M. Young, *Epidermal lesions and mortality caused by vibriosis in deep-sea Bahamian echinoids: A laboratory study*. Diseases of Aquatic Organisms, 2000. **39**(3): p. 193-199.
50. Johnson, P.T., *Studies on diseased urchins from Point Loma*, in W.J. North (Ed.), *Kelp Habitat Improvement Project*. 1971, California Institute of Technology: Pasadena. p. 82-90.
51. Roberts-Regan, D., R. Scheibling, J. Jellett, and D. Roberts-Regan, *Natural and experimentally induced lesions of the body wall of the sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis**. Diseases of Aquatic Organisms, 1988. **5**(1): p. 51-62.
52. Nagelkerken, I., G.W. Snelders, E. Karel, M. Nagelkerken, S. Smith, and S. James, *Sea urchin *Meoma ventricosa* die-off in Curacao (Netherlands Antilles) associated with a pathogenic bacterium*. Diseases of Aquatic Organisms, 1999. **38**(1): p. 71-74.
53. Maes, P. and M. Jangoux, *The bald-sea-urchin disease: a biopathological approach*. Helgoländer Meeresuntersuchungen, 1984. **37**(1): p. 217-224.
54. J.S. Pearse, D.P. Costa, M.B. Yellin, and C.R. Agegian, *Localized mass mortality of red sea urchin, *Strongylocentrotus franciscanus*, near Santa Cruz, California*. Fish. Bull., 1977(53): p. 645-648.
55. Miller, R. and A. Colodey, *Widespread mass mortalities of the green sea urchin in Nova Scotia, Canada*. International Journal on Life in Oceans and Coastal Waters, 1983. **73**(3): p. 263-267.
56. Belkin, S., *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. 2005, Boston, MA: Springer US: Boston, MA.
57. Hugenholtz, P., *Exploring prokaryotic diversity in the genomic era*. Genome Biology, 2002. **3**(2): p. reviews0003.1.
58. Tomoosawabe, Yoshitoshiogura, Tokosawabe, Rameshkumar, Masatakasatomi, Fabianol.Thompson, G. Brunogomez, Richardchristen, Fumitomaruyama, and Kenkurokawa, *Updating the *Vibrio* Clades Defined by Multilocus Sequence Phylogeny: Proposal of Eight New Clades, and the Description of *Vibrio tritonius* sp. nov.* Frontiers in Microbiology, 2013. **4**.
59. Erler, R., *Identification and Characterization of *Vibrio* species*. 2015, Alfred-Wegener Institut.
60. Thompson, F.L., T. Iida, and J. Swings, *Biodiversity of vibrios*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(3): p. 403-31.
61. Faury, N., D. Saulnier, F.L. Thompson, M. Gay, J. Swings, and F. Le Roux, **Vibrio crassostreae* sp. nov., isolated from the haemolymph of oysters (*Crassostrea gigas*)*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 6): p. 2137-40.
62. Deng, H., C. He, Z. Zhou, C. Liu, K. Tan, N. Wang, B. Jiang, X. Gao, and W. Liu, *Isolation and pathogenicity of pathogens from skin ulceration disease and viscera ejection syndrome of the sea cucumber *Apostichopus japonicus**. Aquaculture, 2009. **287**(1): p. 18-27.
63. Farto, R., S.P. Armada, M. Montes, J.A. Guisande, M.J. Perez, and T.P. Nieto, **Vibrio lentus* associated with diseased wild octopus (*Octopus vulgaris*)*. J Invertebr Pathol, 2003. **83**(2): p. 149-56.
64. Birkbeck, T.H. and J.W. Treasurer, **Vibrio splendidus*, *Vibrio ichthyenteri* and *Vibrio pacinii* isolated from the digestive tract microflora of larval ballan wrasse*,

- Labrus bergylta* Ascanius, and goldsinny wrasse, *Ctenolabrus rupestris* (L.). J Fish Dis, 2014. **37**(1): p. 69-74.
65. Pérez-Cataluña, A., T. Lucena, E. Tarazona, D.R. Arahal, M.C. Macián, and M.J. Pujalte, *An MLSA approach for the taxonomic update of the Splendidus clade, a lineage containing several fish and shellfish pathogenic Vibrio spp.* Systematic and Applied Microbiology, 2016. **39**(6): p. 361-369.
  66. Vezzulli, L., E. Pezzati, M. Stauder, L. Stagnaro, P. Venier, and C. Pruzzo, *Aquatic ecology of the oyster pathogens Vibrio splendidus and Vibrio aestuarianus.* Environ Microbiol, 2015. **17**(4): p. 1065-80.
  67. Nasfi, H., M. Travers, J. de Lorgeril, C. Habib, T. Sannie, L. Sorieul, J. Gerard, J. Avarre, P. Haffner, D. Tourbiez, T. Renault, D. Furones, A. Roque, C. Pruzzo, D. Cheslett, R. Gdoura, and T. Vallaey, *A European epidemiological survey of Vibrio splendidus clade shows unexplored diversity and massive exchange of virulence factors.* World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2015. **31**(3): p. 461-475.
  68. Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, J.L. Nicolas, M. Gouy, and F. Berthe, *Phylogenetic study and identification of Vibrio splendidus-related strains based on gyrB gene sequences.* Dis Aquat Organ, 2004. **58**(2-3): p. 143-50.
  69. Dieguez, A.L., R. Beaz-Hidalgo, I. Cleenwerck, S. Balboa, P. de Vos, and J.L. Romalde, *Vibrio atlanticus sp. nov. and Vibrio artabrorum sp. nov., isolated from the clams Ruditapes philippinarum and Ruditapes decussatus.* Int J Syst Evol Microbiol, 2011. **61**(Pt 10): p. 2406-11.
  70. Beaz-Hidalgo, R., A.L. Dieguez, I. Cleenwerck, S. Balboa, A. Doce, P. de Vos, and J.L. Romalde, *Vibrio celticus sp. nov., a new Vibrio species belonging to the Splendidus clade with pathogenic potential for clams.* Syst Appl Microbiol, 2010. **33**(6): p. 311-5.
  71. Thompson, F.L., C.C. Thompson, Y. Li, B. Gomez-Gil, J. Vandenberghe, B. Hoste, and J. Swings, *Vibrio kanaloae sp. nov., Vibrio pomeroyi sp. nov. and Vibrio chagasii sp. nov., from sea water and marine animals.* Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 3): p. 753-9.
  72. Hedlund, B.P. and J.T. Staley, *Vibrio cyclotrophicus sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-degrading marine bacterium.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001. **51**(1): p. 61-66.
  73. Thompson, F.L., C.C. Thompson, B. Hoste, K. Vandemeulebroecke, M. Gullian, and J. Swings, *Vibrio fortis sp. nov. and Vibrio hepatarius sp. nov., isolated from aquatic animals and the marine environment.* Int J Syst Evol Microbiol, 2003. **53**(Pt 5): p. 1495-501.
  74. Beaz-Hidalgo, R., A. Doce, J. Pascual, A.E. Toranzo, and J.L. Romalde, *Vibrio gallaecicus sp. nov. isolated from cultured clams in north-western Spain.* Syst Appl Microbiol, 2009. **32**(2): p. 111-7.
  75. Le Roux, F., A. Goubet, F.L. Thompson, N. Faury, M. Gay, J. Swings, and D. Saulnier, *Vibrio gigantis sp. nov., isolated from the haemolymph of cultured oysters (Crassostrea gigas).* Int J Syst Evol Microbiol, 2005. **55**(Pt 6): p. 2251-5.
  76. Kim, D., K.S. Baik, Y.S. Hwang, J.S. Choi, J. Kwon, and C.N. Seong, *Vibrio hemicentroti sp. nov., an alginate lyase-producing bacterium, isolated from the gut microflora of sea urchin (Hemicentrotus pulcherrimus).* Int J Syst Evol Microbiol, 2013. **63**(Pt 10): p. 3697-703.

77. Macián, M.C., W. Ludwig, R. Aznar, P.A. Grimont, K.H. Schleifer, E. Garay, and M.J. Pujalte, *Vibrio lentus* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2001. **51**(4): p. 1449-1456.
78. Ruimy, R., V. Breittmayer, P. Elbaze, B. Lafay, O. Boussemart, M. Gauthier, and C. Richard, *Phylogenetic Analysis and Assessment of the Genera Vibrio, Photobacterium, Aeromonas, and Plesiomonas Deduced from Small-Subunit rRNA Sequences*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994. **44**(3): p. 416-426.
79. Baumann, P., L. Baumann, S.S. Bang, and M.J. Woolkalis, *Reevaluation of the taxonomy of Vibrio, beneckeae, and Photobacterium: Abolition of the genus Beneckeae*. Current Microbiology, 1980. **4**(3): p. 127-132.
80. Thompson, F.L., C.C. Thompson, and J. Swings, *Vibrio tasmaniensis* sp. nov., isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). Systematic and Applied Microbiology, 2003. **26**(1): p. 65-69.
81. Lasa, A., A.L. Dieguez, and J.L. Romalde, *Vibrio toranzoniae* sp. nov., a new member of the Splendidus clade in the genus Vibrio. Syst Appl Microbiol, 2013. **36**(2): p. 96-100.
82. Drews, G., *The roots of microbiology and the influence of Ferdinand Cohn on microbiology of the 19th century*. 2000: Oxford, UK. p. 225-249.
83. Bossis, E., P. Lemanceau, X. Latour, and L. Gardan, *The taxonomy of Pseudomonas fluorescens and Pseudomonas putida: current status and need for revision*. Agronomie, 2000. **20**(1): p. 51-63.
84. Janda, J.M. and S.L. Abbott, *16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls*. Journal of Clinical Microbiology, 2007. **45**(9): p. 2761.
85. Patel, J.B., *16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory*. Mol Diagn, 2001. **6**(4): p. 313-21.
86. George, E.F., J.M. Linda, E.B. William, S.W. Ralph, and R.W. Carl, *Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977. **74**(10): p. 4537.
87. Brito, A., V. Ramos, R. Mota, S. Lima, A. Santos, J. Vieira, C.P. Vieira, J. Kastovsky, V.M. Vasconcelos, and P. Tamagnini, *Description of new genera and species of marine cyanobacteria from the Portuguese Atlantic coast*. Mol Phylogenet Evol, 2017. **111**: p. 18-34.
88. Yoon, J., *Erythrobacter alti* sp. nov., a marine alphaproteobacterium isolated from seawater. Arch Microbiol, 2017.
89. Lee, J.Y., P.S. Kim, D.W. Hyun, H.S. Kim, N.R. Shin, M.J. Jung, J.H. Yun, M.S. Kim, T.W. Whon, and J.W. Bae, *Microbulbifer echini* sp. nov., isolated from the gastrointestinal tract of a purple sea urchin, *Heliocidaris crassispina*. Int J Syst Evol Microbiol, 2017. **67**(4): p. 998-1004.
90. Frana, L.T.C., E. Carrilho, and T.B.L. Kist, *A review of DNA sequencing techniques*. Quart. Rev. Biophys., 2002. **35**(2): p. 169-200.
91. Sawabe, T., K. Kita-Tsukamoto, and F.L. Thompson, *Inferring the Evolutionary History of Vibrios by Means of Multilocus Sequence Analysis*. The Journal of Bacteriology, 2007. **189**(21): p. 7932.
92. Thompson, F.L., D. Gevers, C.C. Thompson, P. Dawyndt, S. Naser, B. Hoste, C.B. Munn, and J. Swings, *Phylogeny and Molecular Identification of Vibrios on the Basis*

- of Multilocus Sequence Analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(9): p. 5107.
93. Le Roux, F., M. Gay, C. Lambert, M. Waechter, S. Poubalanne, B. Chollet, J.-L. Nicolas, and F. Berthe, *Comparative analysis of Vibrio splendidus-related strains isolated during Crassostrea gigas mortality events*. Aquatic Living Resources, 2002. **15**(4): p. 251-258.
  94. Gabriel, M.W., G.Y. Matsui, R. Friedman, and C.R. Lovell, *Optimization of multilocus sequence analysis for identification of species in the genus vibrio.(Report)*. Applied and Environmental Microbiology, 2014. **80**(17): p. 5359-5365.
  95. Thompson, C.C., F.L. Thompson, K. Vandemeulebroecke, B. Hoste, P. Dawyndt, and J. Swings, *Use of recA as an alternative phylogenetic marker in the family Vibrionaceae*. Int J Syst Evol Microbiol, 2004. **54**(Pt 3): p. 919-24.
  96. Machado, H. and L. Gram, *The fur gene as a new phylogenetic marker for Vibrionaceae species identification.(Report)*. 2015. **81**(8): p. 2745-2752.
  97. Eisen, J., *The RecA protein as a model molecule for molecular systematic studies of bacteria: Comparison of trees of RecAs and 16S rRNAs from the same species*. Journal of Molecular Evolution, 1995. **41**(6): p. 1105-1123.
  98. Ludwig, W. and H.-P. Klenk, *Overview: A Phylogenetic Backbone and Taxonomic Framework for Prokaryotic Systematics*, in *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume One : The Archaea and the Deeply Branching and Phototrophic Bacteria*, D.R. Boone, R.W. Castenholz, and G.M. Garrity, Editors. 2001, Springer New York: New York, NY. p. 49-65.
  99. Zeigler, D.R., *Gene sequences useful for predicting relatedness of whole genomes in bacteria*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003. **53**(6): p. 1893-1900.
  100. Lloyd, A. and P. Sharp, *Evolution of the recA gene and the molecular phylogeny of bacteria*. Journal of Molecular Evolution, 1993. **37**(4): p. 399-407.
  101. Undlien, D., *En ny æra for DNA-sekvensering – nye muligheter og nye utfordringer i humanmedisin*, in *Genialt*. 2010, Bioteknologinemda.
  102. Fleischmann, R.D., M.D. Adams, and O. White, *Whole-genome random sequencing and assembly of Haemophilus influenzae Rd*. Science, 1995. **269**(5223): p. 496-512.
  103. Amaral, G.R.S., G.M. Dias, M. Wellington-Oguri, L. Chimetto, M.E. Campeão, F.L. Thompson, and C.C. Thompson, *Genotype to phenotype: identification of diagnostic vibrio phenotypes using whole genome sequences*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2014. **64**(2): p. 357-365.
  104. Chang Fu, T., Z. Yuan Jie, Z. Yan Ming, L. Qin Qin, Z. Yun Zeng, L. Dong Fang, W. Shuang, W. Jun, B.G. Luz, L. Ying Rui, and C. Wen Xin, *Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2012. **109**(22): p. 8629.
  105. Zhang, Y.M., C.F. Tian, X.H. Sui, W.F. Chen, W.X. Chen, and J.H. Badger, *Robust Markers Reflecting Phylogeny and Taxonomy of Rhizobia (Robust Phylogenetic and Taxonomic Markers)*. 2012. **7**(9): p. e44936.
  106. Ziegler, D., J. Pothier, J. Ardley, R. Fossou, V. Pflüger, S. Meyer, G. Vogel, M. Tonolla, J. Howieson, W. Reeve, and X. Perret, *Ribosomal protein biomarkers provide root nodule bacterial identification by MALDI-TOF MS*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015. **99**(13): p. 5547-5562.

107. Ferreira, L., F. Sánchez-Juanes, P. García-Fraile, R. Rivas, P.F. Mateos, E. Martínez-Molina, J.M. González-Buitrago, E. Velázquez, and B. Adler, *MALDI-TOF Mass Spectrometry Is a Fast and Reliable Platform for Identification and Ecological Studies of Species from Family Rhizobiaceae (Identification of Rhizobiaceae with MALDI-TOF MS)*. PLoS ONE, 2011. **6**(5): p. e20223.
108. Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, B. La Scola, P.-E. Fournier, J.M. Rolain, and D. Raoult, *Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry.(Clinical report)*. Clinical Infectious Diseases, 2009. **49**(4): p. 543.
109. Anhalt, J.P. and C. Fenselau, *Identification of bacteria using mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1975. **47**(2): p. 219-225.
110. Demirev, P., A. Feldman, J. Lin, and P. Demirev, *Bioinformatics-Based Strategies for Rapid Microorganism Identification by Mass Spectrometry*. Johns Hopkins APL Technical Digest, 2004. **25**(1): p. 27-37.
111. Everley, R., T. Mott, S. Wyatt, D. Toney, and T. Croley, *Liquid chromatography/mass spectrometry characterization of Escherichia coli and Shigella species*. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2008. **19**(11): p. 1621-1628.
112. Mazzeo, M.F., A. Sorrentino, M. Gaita, G. Cacace, M. Di Stasio, A. Facchiano, G. Comi, A. Malorni, and R.A. Siciliano, *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for the Discrimination of Food-Borne Microorganisms*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(2): p. 1180.
113. Eddabra, R., G. Prévost, and J.-M. Scheffel, *Rapid discrimination of environmental Vibrio by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. Microbiological Research, 2012. **167**(4): p. 226-230.
114. Emami, K., V. Askari, M. Ullrich, K. Mohinudeen, A.C. Anil, L. Khandeparker, J.G. Burgess, E. Mesbahi, and J.H. Badger, *Characterization of Bacteria in Ballast Water Using MALDI-TOF Mass Spectrometry (Detection of Ballast Water Bacteria by MALDI-TOF)*. PLoS ONE, 2012. **7**(6): p. e38515.
115. Stafsnes, M., M. Dybwad, A. Brunsvik, and P. Bruheim, *Large scale MALDI-TOF MS based taxa identification to identify novel pigment producers in a marine bacterial culture collection*. Antonie van Leeuwenhoek, 2013. **103**(3): p. 603-15.
116. Ringø, E., *The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study*. Aquaculture Research, 2008. **39**(2): p. 171-180.
117. Freiwald, A. and S. Sauer, *Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry*. Nat. Protocols, 2009. **4**(5): p. 732-742.
118. Unkles, S.E., *Bacterial flora of the sea urchin Echinus esculentus*. Applied and Environmental Microbiology, 1977. **34**(4): p. 347-350.
119. Nelson, L., B. Blair, C. Murdock, M. Meade, S. Watts, and A.L. Lawrence, *Molecular Analysis of Gut Microflora in Captive-Raised Sea Urchins (Lytechinus variegatus)*. Journal of the World Aquaculture Society, 2010. **41**(5): p. 807-815.
120. Lopez, J.R., A.L. Dieguez, A. Doce, E. De la Roca, R. De la Herran, J.I. Navas, A.E. Toranzo, and J.L. Romalde, *Pseudomonas baetica sp. nov., a fish pathogen isolated from wedge sole, Dicologlossa cuneata (Moreau)*. Int J Syst Evol Microbiol, 2012. **62**(Pt 4): p. 874-82.
121. Liu, R., L. Qiu, Z. Yu, J. Zi, F. Yue, L. Wang, H. Zhang, W. Teng, X. Liu, and L. Song, *Identification and characterisation of pathogenic Vibrio splendidus from Yesso*



- scallop (Patinopecten yessoensis) cultured in a low temperature environment. J Invertebr Pathol, 2013. 114(2): p. 144-50.*
122. Wardlaw, A.C. and S.E. Unkles, *Bactericidal activity of coelomic fluid from the sea urchin Echinus Esculentus*. Journal of Invertebrate Pathology, 1978. **32**(1): p. 25-34.
  123. Tajima, K., T. Hirano, M. Shimizu, and Y. Ezura, *Isolation and pathogenicity of the causative bacterium of spotting disease of sea urchin Strongylocentrotus intermedius*. Fisheries science, 1997. **63**(2): p. 249-252.
  124. Hernroth, B., *The influence of temperature and dose on antibacterial peptide response against lipopolysaccharide in the blue mussel, Mytilus edulis*. Fish Shellfish Immunol, 2003. **14**(1): p. 25-37.
  125. Machado, H., J. Cardoso, S. Giubergia, K. Rapacki, and L. Gram, *FurIOS: A Web-Based Tool for Identification of Vibrionaceae Species Using the fur Gene*. Frontiers in Microbiology, 2017. **8**(414).
  126. Duperthuy, M., J. Binesse, F. Le Roux, B. Romestand, A. Caro, P. Got, A. Givaudan, D. Mazel, E. Bachère, and D. Destoumieux-Garzón, *The major outer membrane protein OmpU of Vibrio splendidus contributes to host antimicrobial peptide resistance and is required for virulence in the oyster Crassostrea gigas*. Environmental Microbiology, 2010. **12**(4): p. 951-963.
  127. Goo, S.Y., H.J. Lee, W.H. Kim, K.L. Han, D.K. Park, H.J. Lee, S.M. Kim, K.S. Kim, K.H. Lee, and S.J. Park, *Identification of OmpU of Vibrio vulnificus as a fibronectin-binding protein and its role in bacterial pathogenesis*. Infect Immun, 2006. **74**(10): p. 5586-94.
  128. Mathur, J. and M.K. Waldor, *The Vibrio cholerae ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides*. Infect Immun, 2004. **72**(6): p. 3577-83.
  129. Binesse, J., C. Delsert, D. Saulnier, M.C. Champomier-Verges, M. Zagorec, H. Munier-Lehmann, D. Mazel, and F. Le Roux, *Metalloprotease vsm is the major determinant of toxicity for extracellular products of Vibrio splendidus*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(23): p. 7108-17.

## 9 Appendiks 1

### 1.1 MALDI Biotyper Realtime Classification (RTC)

Currently, biochemical tests form the basis of most techniques used to identify microorganisms. Reagents that are metabolized only by specific organisms are added to cultures. This leads, for example, to a characteristic color change of the added reagent, which can then be compared with reference values. Correlating the results of a number of such tests on a sample culture provides an indication of the organism's identity.

#### 1.1.1 Identifying Microorganisms using Mass Spectrometry

The MALDI Biotyper uses a different methodology: it identifies microorganisms by analyzing the expression of their intrinsic proteins using mass spectrometry. This mass spectral pattern of protein expression is compared with reference patterns in a database (a list of the entries contained in the reference database can be obtained on request).

Starting material for a classification using the MALDI Biotyper is an individual colony from an overnight culture on an agar plate. The sample is transferred to a position on a MALDI target and air-dried.

After drying, a small quantity of matrix solution is added. The organic solvent in the matrix solution extracts proteins from the microorganisms. The extracted proteins are mainly ribosomal proteins, which are present in high concentrations.

Once the matrix has crystallized, sample preparation is complete and the samples can be analysed.

If this straightforward sample preparation method is unsuccessful, a supplementary protocol containing short chemical extraction steps can be used to increase the range of organisms that can be identified by MALDI analysis.

MALDI (matrix- assisted laser desorption/ionization) TOF (Time of Flight) mass spectrometry forms the basis of MALDI Biotyper analyses. A laser in the MALDI-TOF mass spectrometer irradiates the matrix/sample mixture, evaporating the matrix and releasing positively charged proteins in a so-called "soft" ionization process. The ability of the matrix to absorb UV light and transfer protons onto the extracted proteins is crucial to this process.

The protein ions are electrostatically accelerated over a short distance and arrive in the flight tube at a speed that is proportional to their mass. Protein ions with different masses arrive at the detector after different time periods. Simply by measuring the time between pulsed acceleration and the corresponding detector signal (in the nanosecond range), the speed of the ions can be measured very precisely and converted into an accurate molecular mass.

### **1.1.2 Generating a 'Molecular Fingerprint'**

MALDI Biotyper analysis generates a characteristic mass and intensity distribution of the mainly ribosomal proteins. Because this mass spectrum is species-specific for a large number of microorganisms, it represents a 'molecular fingerprint'. Unknown microorganisms can be identified by comparing their 'fingerprint' with the thousands of patterns in the reference database.

The first step of data processing is transferring acquired mass spectra into peak lists. In a second step, these peak lists are compared with every pattern in the reference database.

### **1.1.3 Calculating a Score Value**

The matching algorithm used to compare patterns computes three separate values for three fundamental characteristics of the sample and the reference spectra.

1. First, the number of signals in the reference spectrum that have a closely matching partner in the unknown spectrum are calculated. No matches returns a value = 0 and a complete match returns a value = 1.
2. Then, the number of signals in the unknown spectrum that have a closely matching partner in the reference spectrum are determined. No matches returns a value = 0 and a complete match returns a value = 1.

3. Finally, the symmetry of the matching signal pairs is computed. If the high-intensity signals of the unknown spectrum correspond with the high-intensity signals of the reference spectrum and the low-intensity signals also correspond, this results in high symmetry value and the so-called correlation matrix yields a value close to 1. If the matching pairs of signals show no symmetry at all, this results in a value close to 0.

These three values are multiplied together and the result is normalized to 1000. The score value is the common (decadic) logarithm of this result. The maximum obtainable score value is 3 (=  $\log 1000$ ).

Subsequent ranking of the score values puts the best match at the top of the list. The higher the score value, the more probable the classification of the species. A color-coded display of the score value enables rapid evaluation of the results.

Score values  $\geq 2.0$  can be considered as a probable classification.

**It is important to realize that a score value generated by MALDI Biotyper RTC represents a probability that the unknown microorganism is a species in the MALDI Biotyper database.**

## 3.3 MALDI Biotyper OC Workflows

The MALDI Biotyper can be used to:

- Classify unknown organisms using:
  - Raw spectra or MSPs (see section 3.4)
  - Composite Correlation Index matrices (see section 3.8.3)
- Refine classifications of closely-related organisms using subtyping MSPs (see section 3.4.4)
- Organize spectra from characterized organisms into taxonomy trees and MSP libraries (see section 3.5)
- Investigate relationships between microorganisms using:
  - PCA dendrograms and Scores and Loadings tables (see section 3.7)
  - MSP dendrograms (see section 3.6)
  - CCI matrices (see section 3.8.1)

### 3.3.1 Raw Spectra and MSPs

The basic input for MALDI Biotyper workflows is raw spectra, either from unknown or characterized microorganisms. Before being preprocessed, raw spectra must be selected and loaded into the MALDI Biotyper program (see section 3.3.2)

Preprocessing methods (see section 3.3.4) control the transformation of raw spectra into peak lists. Further processing methods (see section 3.3.3) control the transformation of the generated peak lists and the algorithms used to generate results.

Some MALDI Biotyper processes require MSPs as a starting point. MSPs are created from raw spectra using a standard preprocessing method and an MSP creation method. Once created, MSPs are stored in the database and are managed in the Table View (see section 3.2.5).

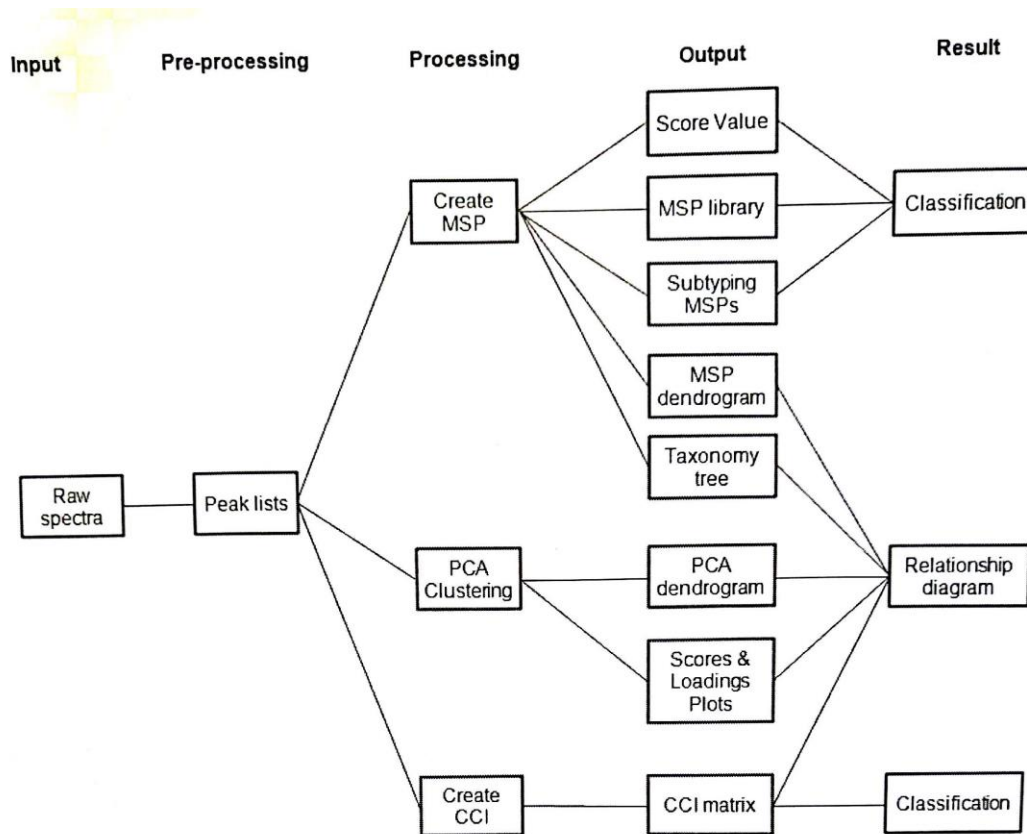


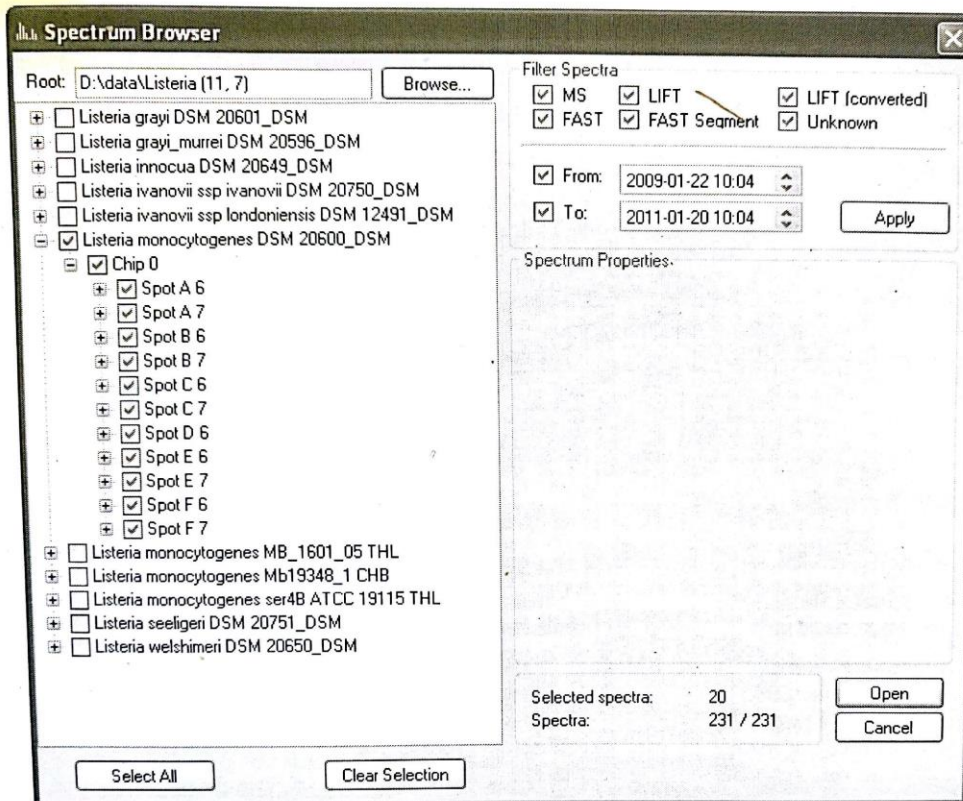
Figure 3-2 MALDI Biotyper offline classification processing schema

### 3.3.2 Loading Spectra and MSPs into the File View

#### 3.3.2.1 Handling Spectra

Before being processed (for example in MSP creation or PCA clustering) raw spectrum files must be loaded into the File View using the **Spectrum Browser**.

## Using the Spectrum Browser



**Figure 3-3 MALDI Biotyper Spectrum Browser**

The Spectrum Browser displays a tree containing all spectra in and below the selected **Root** folder that meet the selected filter criteria.

By default, folder nodes are collapsed and cleared. Click  to expand folders. Select the box next to the folder name to enable spectrum import.

Click **Select All** to select all boxes in the tree. Click **Clear Selection** to clear all boxes.

## Filtering Spectra

Selecting options in the **Filter Spectra** area of the Spectrum Browser enables spectra to be filtered according to:

- type (**MS, LIFT, LIFT (converted), FAST, FAST Segment, Unknown**) and/or
- date of acquisition (**From, To**).

Selecting/clearing a spectrum type option automatically updates the spectrum tree.

To apply date of acquisition filtering, select the desired folder and click **Apply**.


By default, all spectrum types are selected and date filters are cleared, i.e. no filtering occurs.

The **Spectrum Properties** area displays the properties of the spectrum currently selected in the spectrum tree.

**Selected spectra** displays the number of spectra selected in the spectrum tree.

**Spectra** displays the number of filtered spectra listed in the spectrum tree followed by the total number of spectra contained in the selected folder.

### ►► To load spectra into the File View


1. Launch the Spectrum Browser window by select **File > Add Spectra** or clicking .
2. Click **Browse**, navigate to the desired spectrum file folder and click **OK**.

Folders and subfolders containing spectra will appear in the main body of the window. Use the filters to narrow searches.

3. Select the folder(s) containing the desired spectra and click **Open** to load them into the File View.

Click **Select All** to select all boxes in the tree. **Clear Selection** to clear all boxes.

### ►► To remove spectra from the File View

1. Highlight the unwanted spectra.
2. Right-click the highlighted spectra and select **Remove Selected Spectra** from the shortcut menu.
3. To remove all spectra from the File View, select **File > Clear All Spectra** or click .

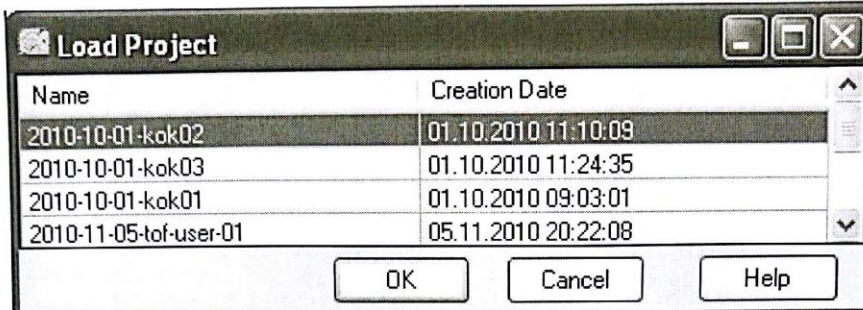
### 3.3.2.2 Loading Spectra from MALDI Biotyper RTC Projects

Spectra from MALDI Biotyper RTC projects can be directly loaded into MALDI Biotyper for further analysis or processing (e.g. PCA, subtyping or MSP creation).

►► To load a MALDI Biotyper RTC Project

1. Select **Action > Open Realtime Classification Project**.

The **Load Project** dialog opens.



**Figure 3-5** Load Project dialog

2. Select the desired project and click **OK**.

The spectra files in the project are loaded into the File View Spectrum tab. The raw spectrum and the classification results of the currently highlighted spectrum are displayed in the Spectrum View and Spectrum Scores table respectively.

**Note** This feature requires that the raw spectra files are available on the local computer.

### 3.3.2.3 Handling MSPs


MSPs can be added to the File View MSP page for classification.

►► To load MSPs into the File View

1. Move the desired MSPs into the Current MSP or Selected MSP table.
2. Highlight and right-click the MSPs and select **Add MSPs for Identification** from the shortcut menu.

►► To remove MSPs from the File View

1. Highlight and right-click the unwanted MSPs and select **Remove Selected MSPs** from the shortcut menu.

To remove all MSPs from the File View, select **File > Clear All MSPs** or click .



### 3.3.2.4 Selecting Spectra and MSPs for Processing

#### ►► To highlight spectra and MSPs for processing

For some workflows (manual preprocessing, classification, MSP creation), spectra / MSPs must be highlighted in the File View before processing.

- To highlight a single spectrum / MSP, click it with the left mouse button.
- To highlight multiple consecutive spectra / MSPs, hold down the Shift key and click the first and last member of the series.
- To highlight multiple non-consecutive spectra / MSPs, hold down the Ctrl key and click the desired spectra / MSPs.
- Highlighted spectra / MSPs have a blue background.

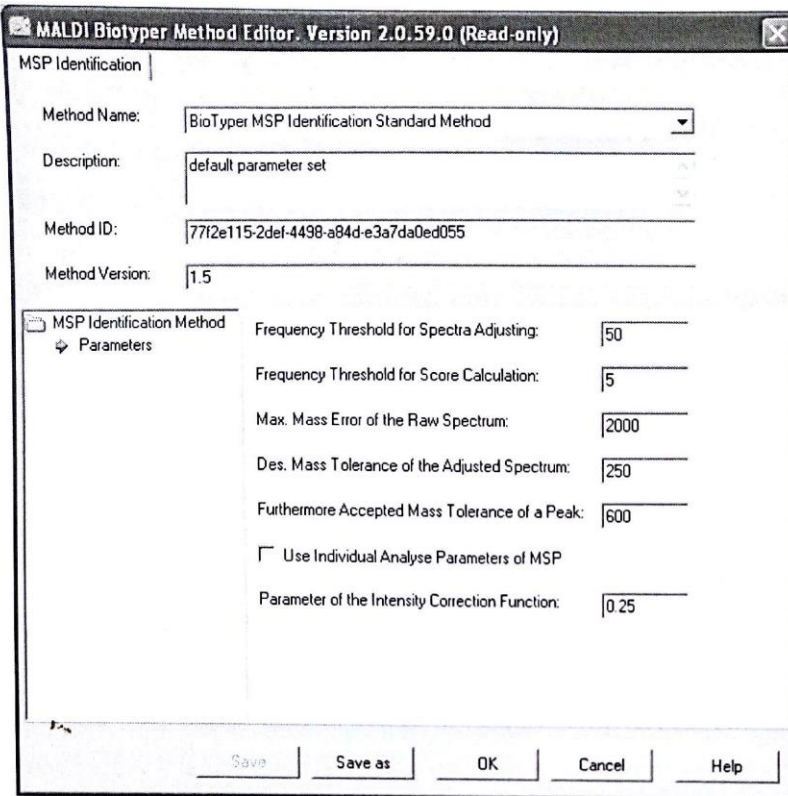
### 3.3.3 Creating, Editing and Selecting Processing Methods

MALDI Biotyper workflows are controlled by processing methods.

- Preprocessing Methods — used to generate peak lists from raw spectra.
- MSP Identification Methods — used to identify the sample from which the spectrum was obtained.
- MSP Creation Methods — used to create an MSP from selected spectra.
- Subtyping MSP Creation Methods — used to create subtyping MSPs from an MSP.
- PCA Creation Methods — used to perform principal component analysis on preprocessed spectra.
- PCA Clustering Methods — used to cluster preprocessed spectra based on the result of the PCA.
- MSP Dendrogram Creation Methods — used to create a dendrogram from selected MSPs.
- Composite Correlation Index Methods — used to calculate a CCI matrix.

#### 3.3.3.1 The MALDI Biotyper Method Editor

The MALDI Biotyper Method Editor enables users to view, create and edit processing methods. The editor is launched by selecting **Edit > Method > [method type]** or **Action > [method type] > Edit Method** from the respective top-level menu.



**Figure 3-6 MALDI Biotyper Method Editor**

The currently active method is displayed in the **Method Name** field. Each installation of the MALDI Biotyper software contains a read-only default parameter set for each process (Biotyper [method type] Standard Method).

The editor also displays an optional **Description** and the method's unique **Method ID** and **Method Version** which cannot be changed.

The main body of the editor displays the parameters and current settings for the respective method type.

►► **To view currently active processing methods and their parameters**

1. Select **Edit > Method > [method type]** to launch the MALDI Biotyper Method Editor.

The currently active method and its parameters are displayed.

2. Click **OK** to close the MALDI Biotyper Method Editor.

**Table 3-1 MALDI Biotyper processing methods**

<b>Method Type</b>	<b>Input</b>	<b>Output</b>
Preprocessing	Raw spectra	Peak lists
MSP Identification	Raw spectra or MSPs	Classification of microorganism
MSP Creation	Peak lists of preprocessed spectra	MSP (reference spectrum)
Subtyping MSP Creation	MSPs	Subtyping MSPs
PCA Creation	Preprocessed spectra	Principal Component Analysis
PCA Clustering	Preprocessed spectra + PCA	PCA cluster diagram
MSP Dendrogram Creation	MSPs	MSP dendrogram
Composite Correlation Index Calculation	Preprocessed spectra	CCI matrix

### 3.3.3.2 Creating and Editing Custom Processing Methods

Custom processing methods are created by editing a copy of a default method and saving it under a different name.

#### ►► To create a custom processing method

1. Select **Edit > Method > [method type]** to launch the MALDI Biotyper Method Editor.  
Optional: Enter a description of the new method in the **Description** input field.
2. Adjust the parameters as desired.

**Note** Preprocessing method parameters are divided into groups (Mass Adjustment, Smoothing, etc.). The currently displayed group is indicated by a gray arrow ➔.

3. Click **Save As** and enter a new **Method Name** into the **Insert New [method type] Method Name** dialog.

The method will be saved with a new **Method ID** and **Method Version** number.

4. Click **OK** to close the MALDI Biotyper Method Editor and make the new method active.

The new method will be active until a different method is selected from the **Method Name** drop-down list and **OK** is clicked.

#### ►► To edit a custom processing method

1. Select **Edit > Method > [method type]** to launch the MALDI Biotyper Method Editor.
2. Select the method to be edited from the **Method Name** drop-down list.
3. Adjust the parameters as desired.
4. Click **Save**.

The method is saved under the same **Method Name** with a new **Method ID**.

5. Click **OK** to close the MALDI Biotyper Method Editor and make the edited method active.

### 3.3.3.3 Selecting Processing Methods

#### ►► To select a processing method

1. Select **Edit > Method > [method type]** to launch the MALDI Biotyper Method Editor.
2. Select the desired method from the **Method Name** drop-down list.
3. Click **OK** to close the MALDI Biotyper Method Editor and make the chosen method active.

### 3.3.4 Preprocessing Spectra

Preprocessing methods are used to generate peak lists from raw spectra. Because the amount of information required for each workflow is different, preprocessing methods can be optimized to speed up analysis and reduce data set size.

#### 3.3.4.1 Default Preprocessing Methods

Each installation of the MALDI Biotyper software contains three read-only preprocessing methods for use during the classification, MSP creation, PCA clustering and CCI calculation workflows.

### 3.3.4.2 Custom Preprocessing Methods

Users can develop custom preprocessing methods by stepwise optimization of the individual preprocessing method parameters listed on the Preprocessing page of the MALDI Biotyper Method Editor.

#### ►► To create a custom preprocessing method

1. Select **Edit > Method > Preprocessing** to launch the MALDI Biotyper Method Editor.

Optional: Enter a description of the new method in the **Description** input field.

2. Adjust the parameters as desired.

Preprocessing method parameters are divided into groups. The currently displayed parameter group is indicated by a gray arrow ➔.

3. Click **Save As** and enter a new **Method Name** into the **Insert New Preprocessing Method Name** dialog.

The method will be saved with a new **Method ID** and **Method Version** number.

4. Click **OK** to close the MALDI Biotyper Method Editor and make the new method active.

The new method will be active until a different method is selected from the **Method Name** drop-down list and **OK** is clicked.

#### Mass Adjustment

The **Mass Adjustment** parameters define whether and how to adjust masses in spectra during preprocessing.

## Smoothing

The **Smoothing** parameters define whether and how to smooth spectra during preprocessing. MALDI Biotyper supports the Savitsky-Golay smoothing method.

## Baseline Subtraction

The **Baseline Subtraction** parameters define whether and how to perform baseline subtraction on spectra during preprocessing. MALDI Biotyper supports the Multipolygon, Minimum, Penalized least squares and Penalized B-Spline baseline subtraction methods.

## Normalization

The **Normalization** parameters define how to normalize spectra during preprocessing. MALDI Biotyper supports the Maximum Norm and P-Norm normalization methods.

## Peak Picking

The **Peak Picking** parameters define how to pick peaks on spectra during preprocessing. MALDI Biotyper supports the Spectra Differentiation, Peak Fitting and Local Maximum peak picking methods.

### ►► To check the effect of a preprocessing method on raw spectra

The optimization can be checked using commands in the **Action > Preprocessing** menu. Selecting these commands applies the respective active parameters to raw spectra and displays the resulting processed spectra in the Spectrum View.

1. Load and highlight the desired spectra (see section 3.3.2.2).

The highlighted spectra are displayed in blue in the Spectrum View.

2. Select **Edit > Method > Preprocessing**. Select the desired method from the **Method Name** drop-down list in the MALDI Biotyper Method Editor and click **OK**.
3. Check the effect of the individual parameter settings by:

- a. Selecting **Action > Preprocessing > Adjust Mass**.

The mass-adjusted spectrum is generated for all highlighted spectra and displayed in orange overlaid on the raw spectrum.

- b. Selecting **Action > Preprocessing > Smooth**.

The mass-adjusted, smoothed spectrum is generated for all selected spectra and is displayed in purple overlaid on the raw spectrum.

c. Selecting **Action > Preprocessing > Subtract Baseline**.

The mass-adjusted, smoothed, baseline-subtracted spectrum is generated for all selected spectra and is displayed in cyan overlaid on the raw spectrum.

d. Selecting **Preprocessing > Normalize**.

The mass-adjusted, smoothed, baseline-subtracted, normalized spectrum is generated for all selected spectra and is displayed in green in the Spectrum View.

e. Selecting **Action > Preprocessing > Pick Peaks**.

The peak picking result is generated for all selected spectra and displayed in red using an inverted intensity scale below the preprocessed spectrum.

f. Selecting **Action > Preprocessing > Batch Processing**.

The steps a – e above can be performed using a single command. **Batch Processing** generates the peak picking result for all selected spectra.