



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2023 60 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Persistens og plasmidoverføring hos cefalosporin-resistente *Escherichia coli* i vann og jord**

Persistence and plasmid transfer in cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in water and soil

**Eira Haugen Sandvik**

Mastergrad i Bioteknologi

## FØRORD

Dette er en masteroppgave som utgjør 60 studiepoeng på studiet Bioteknologi retning mikrobiologi ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet (NMBU) ved fakultetet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap (KBM). Arbeidet ble utført ved Veterinærinstituttet. Det har vært en bratt læringskurve med mye nytt og interessant på kort tid. Det oppleves meningsfullt å ha fått muligheten til å jobbe med en så viktig problemstilling som antibiotikaresistens. Det har også vært spennende å være en del av et forskningsmiljø i denne perioden.

Jeg ønsker å takke mine to hovedveiledere ved Veterinærinstituttet, Gro Skøien Johannessen og Solveig Sølverød Mo, som ga uvurderlig hjelp og viste et stort engasjement for mitt arbeid gjennom hele prosessen med denne oppgaven. Jeg vil også takke min NMBU veileder Morten Kjos for raske og konstruktive tilbakemeldinger på alle mine spørsmål. Videre ønsker jeg å takke Bjørn Spilsberg og Saima Nasrin Mohammad for god veiledning og bistand i forbindelse med real-time PCR analysene. Takk til Medieproduksjonen som har vært veldig behjelpelige ved hyppige bestillinger av medier i stor skala. Ønsker også å gi en takk til Basma Asal som har vært en god støttespiller underveis med det praktiske lab arbeidet. Ikke minst vil jeg gi en stor takk til Kristin Sæbø Pettersen, som var kontorpartner og humørspreder. Jeg vil også takke alle på Veterinærinstituttet som på en eller annen måte har bidratt med god hjelp, veiledning eller svar på spørsmål. Til slutt en takk til vedkommende som hjalp meg tilbake til laben da jeg som nybegynner hadde gått meg vill i kjelleren.

Høydalsmo, mai 2023

Eira Haugen Sandvik

## ABSTRACT

Antibiotic resistance in bacteria is a growing problem globally. This is a serious threat to modern medicine and public health. The main part of the research in this area has largely been linked to human and veterinary medicine. More recently, there has been a greater focus on the fact that nature can also be an important source and spreading route for antibiotic-resistant bacteria. Nevertheless, the knowledge base in this area is still insufficient and it is uncertain to what extent resistant bacteria and resistance genes can be spread back to humans and livestock.

The two cephalosporin-resistant *E. coli* strains used in these experiments had different phlotypes in addition to having the resistance gene *bla*<sub>CMY-2</sub> respectively located on an IncK or IncII plasmid. The main purpose of the study was to investigate how long the two selected *E. coli* strains could persist in natural water from the lake Årungen and commercially available plant soil at simulated Norwegian summer temperatures (15 °C). In addition, the ability of the plasmids to conjugate to a quinolone-resistant *E. coli* was investigated at 15, 20 and 37 °C in the same matrixes. All experiments were carried out in both autoclaved and non-autoclaved water and soil, as a control for the effect of natural microbial communities on survival and plasmid transfer. Colonies were verified through conventional PCR and real-time PCR.

The cephalosporin-resistant *E. coli* strains persisted well over the experimental period of ten weeks in both water and soil, but significantly better in the autoclaved matrix. Plasmid transfer/conjugation was not detected at temperatures other than 37 °C in the same matrixes. These findings indicate that the probability of plasmid transfer in water and soil environments is low under typical Norwegian summer conditions.

## SAMMENDRAG

Antibiotikaresistens hos bakterier er et økende problem globalt. Dette er en alvorlig trussel mot moderne medisin og folkehelsen. Hoveddelen av forskningen på dette området har naturlig nok vært knyttet til human- og veterinærmedisinen. I senere tid har det blitt større fokus på at naturen også kan være en viktig kilde og spredningsvei for antibiotikaresistente bakterier. Likevel er kunnskapsgrunnlaget på dette området ennå mangelfullt og det er usikkert i hvilken grad resistente bakterier og resistensgener kan spres tilbake til mennesker og husdyr.

De to cefalosporin-resistente *E. coli* stammene som ble brukt i forsøkene hadde ulik fylotype i tillegg til at de hadde resistensgenet *bla<sub>CMY-2</sub>* henholdsvis plassert på et IncK eller IncII plasmid. Hovedhensikten med studien var å undersøke hvor lenge de to utvalgte *E. coli* stammene kunne persistere i naturlig vann fra innsjøen Årungen og kommersiell plantejord ved simulert norsk sommertemperatur (15 °C). I tillegg ble plasmidenes evne til å konjugere til en kinolon-resistent *E. coli* undersøkt ved 15, 20 og 37 °C i de samme matriksene. Alle forsøkene ble gjennomført i både autoklavert og ikke-autoklavert vann og jord, som en kontroll på effekten av naturlige mikrobefunn på overlevelse og plasmidoverføring. Kolonier ble verifisert gjennom konvensjonell PCR og real-time PCR.

De cefalosporin-resistente *E. coli* stammene persisterte godt over forsøksperioden på ti uker i både vann og jord, men betydelig bedre i den autoklaverte matriksen. Det ble ikke påvist plasmidoverføring/konjugasjon ved andre temperaturer enn 37 °C i de samme matriksene. Disse funnene tyder på at sannsynligheten for plasmidoverføring i vann- og jordmiljøer er liten under typiske norske sommerforhold.

## ORDLISTE OG FORKORTELSER

AMR: Antimikrobiell resistens (vanligvis står AMR som en samlebetegnelse for mikroorganismers evne til å overleve behandling med antimikrobielle midler. I denne oppgaven benyttes AMR om antibakteriell resistens)

BPV: Bufret peptonvann

FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FNs organisasjon for ernæring og landbruk)

HGO: Horisontal genoverføring

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

Mating: når donorstamme og resipientstamme inkuberes sammen, slik at overføringen av plasmid fra donor til resipient kan skje via direkte kontakt (pilus)

MC: MacConkey agarskål

MC-cefo: MacConkey agarskål med 1 mg/L cefotaksim

MC-cefo+nal: MacConkey agarskål med 0,5 mg/L cefotaksim og 20 mg/L nalidiksinsyre

MH: Mueller-Hinton agarskål

MH-cefo+nal: Mueller-Hinton agarskål med 0,5 mg/L cefotaksim og 20 mg/L nalidiksinsyre

NORM: Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens hos mikrober

NORM-VET: Norsk overvåkningsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler

Transkonjuganter: resipient som har tatt opp resistensplasmid fra donor gjennom konjugasjon

VI: Veterinærinstituttet

VKM: Vitenskapskomiteen for mat og miljø

WHO: World Health Organization

## INNHALDSFORTEGNELSE

Forord .....	i
Abstract .....	ii
Sammendrag .....	iii
Ordlister og forkortelser .....	iv
1 INTRODUKSJON .....	1
1.1 Antibiotika og antimikrobiell resistens.....	2
1.1.1 Horisontal genoverføring .....	5
1.1.2 Plasmider .....	6
1.2 Cefalosporin-resistens hos <i>E. coli</i> .....	7
1.2.1 AmpC $\beta$ -laktamaser.....	7
1.3 AMR i miljøet.....	8
1.3.1 Hvordan AMR sprer seg via vannsystemer.....	10
1.3.2 Hvordan AMR sprer seg via gjødsling og jord .....	11
1.3.3 Persistens .....	13
1.4 Betydning for folkehelse .....	14
1.5 Forebyggende tiltak og kunnskapshull .....	15
1.6 Målet med forsøkene og forskningsspørsmål .....	17
2 MATERIALE OG METODER .....	18
2.1 Bakteriestammer .....	19

2.2	Matriks.....	20
2.3	Naturlig forekomst av <i>E. coli</i> i matriks .....	20
2.3.1	Screening av vann fra Årungen.....	21
2.3.2	Screening av plantejord.....	21
2.4	Konjugasjonsforsøk i buljong, vann og jord .....	22
2.4.1	Innledende konjugasjonsforsøk i buljong .....	23
2.4.2	Konjugasjonsforsøk i sterilt RO-vann.....	24
2.4.3	Konjugasjonsforsøk i vann fra Årungen .....	24
2.4.4	Konjugasjonsforsøk i plantejord .....	24
2.5	Persistens av cefalosporin-resistente <i>E. coli</i> i vann og jord .....	25
2.5.1	Persistens av cefalosporin-resistente <i>E. coli</i> i autoklavert og ikke-autoklavert vann	26
2.5.2	Persistens av cefalosporin-resistente <i>E. coli</i> i autoklavert og ikke-autoklavert jord	27
2.6	Verifisering.....	28
2.6.1	MALDI-TOF.....	28
2.6.2	Multiplex PCR for påvisning av <i>E. coli</i> fylotype.....	28
2.6.3	Real-time PCR for deteksjon av <i>bla<sub>CMY-2</sub></i> .....	30
2.7	Databehandling og statistisk analyse.....	31
3	RESULTATER.....	34
3.1	Screening .....	34

3.1.1	Screening av vann fra Årungen, autoklavert og ikke-autoklavert.....	34
3.1.2	Screening av plantejord, autoklavert og ikke-autoklavert.....	34
3.2	Konjugasjonsforsøk .....	35
3.2.1	Verifisering av presumptive transkonjuganter fra konjugasjonsforsøkene .....	35
3.2.2	Konjugasjonsforsøk i buljong .....	35
3.2.3	Konjugasjonsforsøk i sterilt RO- vann.....	36
3.2.4	Konjugasjonsforsøk i vann fra Årungen .....	36
3.2.5	Konjugasjonsforsøk i plantejord .....	38
3.3	Persistens av cefalosporin-resistente <i>E. coli</i> i vann og jord .....	39
3.3.1	Persistens av cefalosporin-resistente <i>E. coli</i> i autoklavert og ikke-autoklavert vann	39
3.3.2	Persistens av cefalosporin-resistente <i>E. coli</i> i autoklavert og ikke-autoklavert jord	42
3.3.3	Verifisering av isolater fra persistensforsøkene .....	45
4	DISKUSJON.....	46
4.1	Metodiske betraktninger .....	57
5	Konklusjon og videre arbeid .....	61
6	REFERANSER .....	62
7	Vedlegg .....	71
	Vedlegg 1. Innholdsdeklarasjon for plantejord kjøpt på Maxbo .....	71



Vedlegg 2. Oversikt over uttak for persistensforsøket i autoklavert og ikke-autoklavert jord for begge isolatene.....	73
Vedlegg 3. Oversiktstabell med resultater fra alle PCR-analysene.....	74
Vedlegg 4. Resultater Multipleks PCR.....	81
Vedlegg 5. Real-time PCR rådata.....	90
Vedlegg 6. Normalitetstester .....	95
Vedlegg 7. Gjennomsnitt og standardavvik, vann D1292.....	99
Vedlegg 8. Gjennomsnitt og standardavvik, vann D2798.....	100
Vedlegg 9. Gjennomsnitt og standardavvik, jord D1292 .....	101
Vedlegg 10. Gjennomsnitt og standardavvik, jord D2798 .....	102
Vedlegg 11. Tabulerte verdier for Wilcoxon Signed-Ranks Test .....	103

# 1 INTRODUKSJON

Antimikrobiell resistens (AMR) er et økende problem som ifølge verdens helseorganisasjon (WHO) er høyt oppe på listen over de mest alvorlige helsetruslene globalt (WHO, 2019). Behandling av ulike infeksjonssykdommer med antibiotika hos både mennesker og dyr er essensielt. Det har blitt estimert at opptil 10 millioner dødsfall globalt vil kunne skje som et resultat av AMR innen år 2050 (UNEP, 2023). Dersom den alvorlige trenden med AMR ikke stoppes vil det medføre store økonomiske tap, mange flere dødsfall, redusert mattrygghet og den medisinske fremgangen vil bremses. Flere vil kunne bli syke og dø av infeksjoner som ellers kunne blitt kureret ved hjelp av antibiotika (UNEP, 2023).

I Norge er AMR-situasjonen gunstig sammenlignet med mange andre land, men det vil være svært viktig å holde frem med forebyggende arbeid mot videre utvikling av AMR (Folkehelseinstituttet, 2014). Utviklingen av AMR hos mikrober i Norge overvåkes av Norsk overvåkingssystem for antibiotikaresistens hos mikrober (NORM), Norsk overvåkingsprogram for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler (NORM-VET) og Meldingssystem for smittsomme sykdommer (MSIS). Disse overvåkingssystemene fokuserer først og fremst på AMR hos mennesker, dyr og i matvarer. I flere nye rapporter omtales viktigheten av å inkludere det ytre miljø som et fjerde fokusområde i overvåkingen av AMR (VKM, 2022; Nesse et al., 2021; FAO & WHO, 2019). Med det ytre miljøet menes økosystemer med alt sitt biologiske innhold og fysiske forhold som jord, luft, vann og geologi, men i denne oppgaven begrenses omtalen av det ytre miljø til å i hovedsak gjelde vann og jord. Det ytre miljøet spiller en viktig rolle i spredningen av AMR- bakterier og -gener (UNEP, 2023). Det er tydelig at et mer helhetlig syn på AMR er nødvendig og at miljø også blir ansett som en viktig del av Én-helse («One Health») tilnærmingen (Koutsoumanis et al., 2021; Nesse et al., 2021; VKM, 2022).

Én-helse er en tilnærming der flere sektorer på tvers av ulike fagområder samarbeider og kommuniserer tett. Formålet er å optimalisere helsen til mennesker, dyr og økosystemer på en bærekraftig måte, da disse er nært tilknyttet hverandre. Denne tilnærmingen erkjenner at sammenhengen mellom miljø, mennesker og dyr er høyst relevant og at ved å koble disse fokusområdene sammen og se dem i sammenheng, kan Én-helse bidra til å håndtere sykdom og gi en bedre global helsesikkerhet (WHO, 2022).

For å få en bedre forståelse av spredningen og utviklingen av AMR i det ytre miljøet, er det nødvendig med kartlegging av spredningsveier og drivere i ulike deler av miljøet. Dette gjelder for eksempel spredning i jord, ferskvann, sjø, sedimenter og hos viltlevende dyr (Nesse et al., 2021; VKM, 2022; Miljødirektoratet, 2019). Det har blant annet blitt vist at husdyrgjødsel, vanningsvann og overflatevann som benyttes til plantebasert matproduksjon har stor betydning for spredning av AMR. I slike miljøer har det blitt påvist flere typer AMR- bakterier og -gener som anses å være en stor trussel mot folkehelsen (Koutsoumanis et al., 2021). Dette inkluderer karbapenem-resistente, cefalosporin-resistente (utvidet spektrum) og fluorokinolon-resistente *Enterobacterales*, methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* og glycopeptid-resistent *Enterococcus faecium* med flere. Tilsvarende har det blitt påvist viktige AMR gener (Koutsoumanis et al., 2021), inkludert *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *mcr*, *vanA* og *optrA*. Som et resultat av dette er det viktig at det settes i gang forebyggende tiltak i alle sektorer innen landbruk. Tiltakene må særlig redusere forekomst av fekal mikrobiell forurensing i produksjonsmiljøer, slik at overføringen av AMR bakterier og deres gener i matproduksjonsområder reduseres (Koutsoumanis et al., 2021). Frem til i dag er det begrenset forskning på spredningen av AMR i miljøet. Forskningsmiljøer har i sammenheng med Én-helse tilnærmingen konstatert at det bør opprettes standardiserte metoder for å bedre kunne overvåke AMR i miljøet (VKM, 2022; Koutsoumanis et al., 2021).

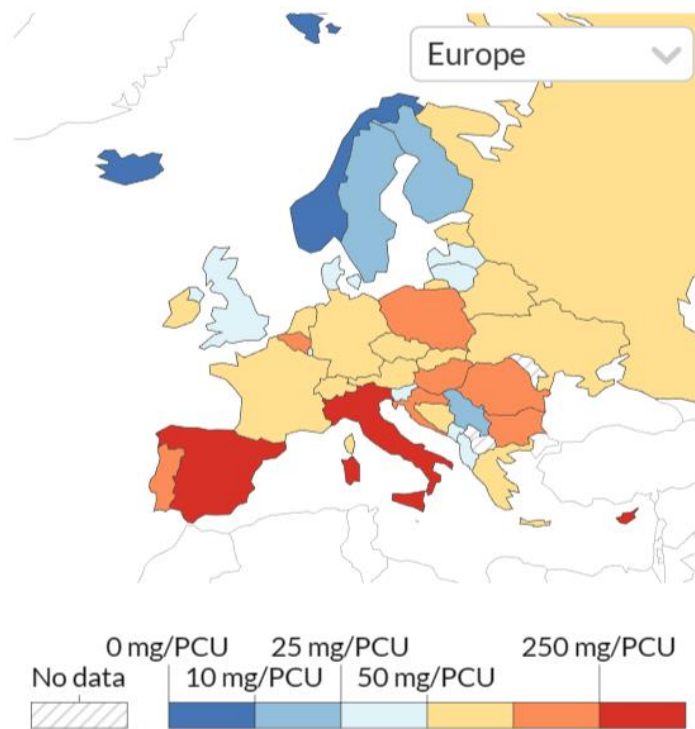
Arbeidet i denne masteroppgaven omhandler persistens og konjugasjon hos to ulike cefalosporin-resistente *E. coli* i vann og jord, og oppgaven blir gjort i regi av prosjektet FED-AMR (<https://onehealthjp.eu/projects/antimicrobial-resistance/jrp-fed-amr>), hvor resultatene vil inngå.

## 1.1 Antibiotika og antimikrobiell resistens

Antibiotika er legemidler som brukes til behandling av bakterielle infeksjoner hos mennesker, dyr og planter. Tidligere ble antibiotika omtalt som naturlig forekommende sekundære metabolitter som ble produsert av bakterier eller sopp som en del av deres naturlige forsvarsmekanisme i kampen mot andre mikrober. Disse metabolittene kunne enten ha en veksthemmende eller drepende effekt mot bakterier. Etterhvert ble det i tillegg til de naturlige antibiotika variantene, utviklet syntetiske og semi-syntetiske antibiotika til behandling av bakterielle infeksjoner (Nicolaou & Rigol, 2018).

I dag finnes et bredt spekter av antibiotika som bekjemper eller hemmer bakterien på ulike måter ved å angripe livsviktige funksjoner i cellen. Dette inkluderer antibiotika som hindrer syntesen av- eller ødelegger bakteriecelleveggen. Penicilliner og cefalosporiner er eksempler på slike antibiotika. I tillegg kan det være antibiotika som påvirker livsviktige proteiner, DNA, RNA eller metabolismen. Eksempelvis vil aminoglykosider og makrolider hemme proteinsyntesen, kinoloner hemmer DNA syntesen og trimetoprim og sulfonamider hemmer metabolismen til bakteriecellen (Rosenblatt-Farrell, 2009).

Helt siden Alexander Fleming oppdaget penicillin i 1928 (Tan & Tatsumura, 2015), har det blitt advart om at overforbruk eller feil bruk av antibiotika kan bidra til et økt seleksjonspress som favoriserer de motstandsdyktige bakterievariantene og dermed gir økt forekomst av AMR (Rosenblatt-Farrell, 2009). Til tross for denne advarselen har både misbruk og overforbruk funnet sted verden over. De hovedansvarlige for det store overforbruket inkluderer helsesektoren og landbruksnæringen (Dadgostar, 2019). Innen helsesektoren blir antibiotika enkelte ganger skrevet ut til pasienter med virale infeksjoner, hvor medisinen ikke vil ha noen virkning og på den måten misbrukes. I tillegg foregår det misbruk og overforbruk av antibiotika i noen land, eksempelvis India og Vietnam. Disse har ikke et strengt regelverk rundt foreskriving og bruk, noe som lar enkeltpersoner få tilgang til antibiotika reseptfritt. I enkelte land blir antibiotika tilført maten til husdyr som videre skal benyttes i dyreproduksjonen. Det blir tilført antibiotika i fôret både til behandling av sykdom hos dyrene og forebygging av sykdom, men også som et vekstmiddel (Dadgostar, 2019). Kina og USA er eksempler på land som bruker store mengder antibiotika i husdyrproduksjonen (Van Boeckel et al., 2015). I Norge ble det forbudt å tilsette antibiotika i fôret til matproduserende dyr i 1995 (Grave et al., 2006). Forekomsten av AMR er svært lav her sammenlignet med flere andre land (Urdahl et al., 2020). I Figur 1 under vises det en oversikt over forbruket av antibiotika i husdyrproduksjonen i Europa. Som figuren viser, er forbruket størst i Sør-Europa og det er stor forskjell mellom landene, selv om også EU innførte forbud mot bruk av antibiotika i husdyrfôr allerede i 2006 (WEF, 2017).



Source: European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (2017) & Van Boeckel et al. (2015)  
CC BY

Figur 1. Oversikt over antibiotikabruk hos matproduserende dyr i ulike Europeiske land i 2016. Målt som totalt forbruk av antibiotika i milligram per kg produsert kjøtt (PCU=population correction unit). Hentet fra nettsiden til Wold Economic Forum. <https://www.weforum.org/agenda/2017/11/three-quarters-of-antibiotics-are-used-on-animals-heres-why-thats-a-major-problem>

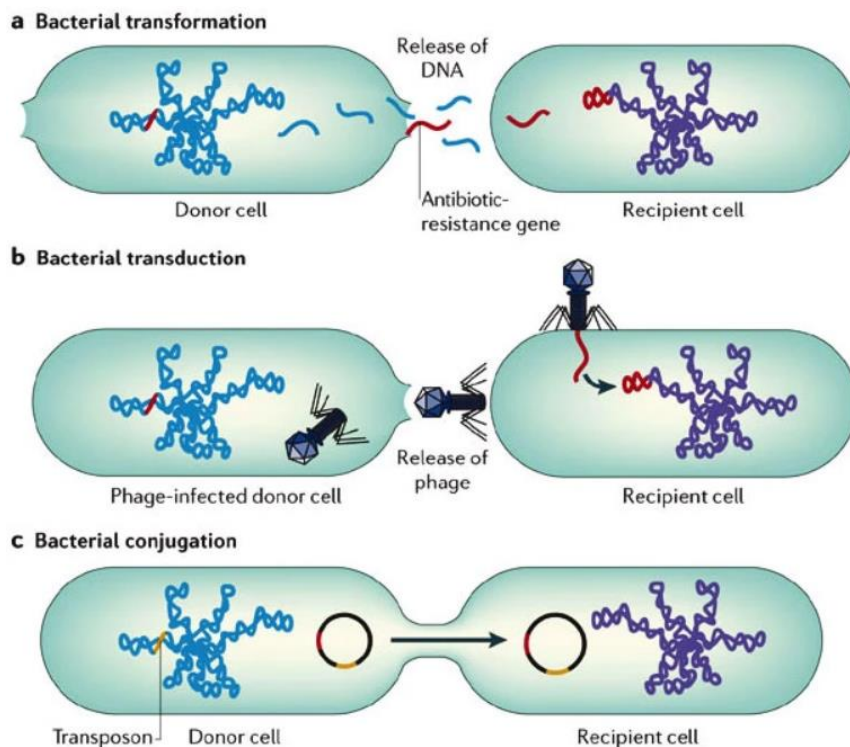
AMR kan være naturlig iboende egenskap hos bakterien, eller den kan erverves. Bakterier med naturlig AMR mot bestemte antibiotika har en iboende forsvarsmekanisme. Et eksempel på en naturlig iboende resistens egenskap er den ytre cellemembranen til Gram-negative bakterier, som gjør dem resistente mot visse antibiotika som ikke klarer å trenge gjennom membranen. For eksempel er Gram-negative bakterier som *E. coli* og *Pseudomonas aeruginosa* resistente mot en gruppe antibiotika kalt makrolider som følge av denne iboende egenskapen (Rosenblatt-Farrell, 2009; Cox & Wright, 2013).

Ervervet AMR oppstår enten ved mutasjoner i bakteriens egne gener, eller ved at bakterien får overført genetisk materiale fra andre bakterier med et AMR gen via horisontal genoverføring (HGO). Dette kan skje mellom bakterier innen samme taksonomiske gruppe, men også mellom ulike grupper. HGO kan deles inn i tre prosesser utfra hvordan det genetiske elementet overføres til den mottakende bakterien (MacGowan & Macnaughton, 2017).

### 1.1.1 Horisontal genoverføring

HGO hos bakterier oppstår når det overføres genmateriale fra en bakterie til en annen og dette er en viktig årsak til at AMR spres raskt mellom bakterier. HGO skiller seg fra vertikal genoverføring der hvor genmateriale overføres ved celledeling, fra foreldre til avkom (Burmeister, 2015). De tre ulike prosessene av HGO er transformasjon, transduksjon og konjugasjon (Figur 2). Transformasjon (også kjent som naturlig transformasjon) oppstår når bakterien har evnen til å ta opp fritt/nakent DNA fra omgivelsene sine. Dette DNAet har sin opprinnelse i andre bakterieceller som er lyserte. Transduksjon oppstår når bakterien får tilført nytt DNA via en bakteriofag (et bakterievirus), mens konjugasjon oppstår når en bakterie overfører DNA til en annen bakterie ved direkte cellekontakt. Ved direkte kontakt mellom en donor (giver av plasmidet) og en resipient (mottaker av plasmidet) dannes en pilus som kobler de to bakteriecellene sammen slik at det genetiske materialet kan overføres. Ofte sees de tre formene for HGO i forbindelse med utvikling av AMR og sykdomsfremkallende bakterier (Soucy et al., 2015; Thomas & Nielsen, 2005).

Transformasjon og transduksjon ser ut til å være noe mindre viktige bidragsyttere i utviklingen og spredningen av AMR hos bakterier generelt (von Wintersdorff et al., 2016). Ved transformasjon kreves det at det nakne DNAet som skal tas opp er homologt (felles evolusjonær historie) mellom donoren og resipienten. Altså vil transformasjon kun foregå mellom nokså nært beslektede bakterier. Når det gjelder transduksjon er dette en prosess der bakteriofagen krever stor grad av vertsspesifisitet og dermed vil det sannsynligvis være mer sjeldent at bakteriofagen overfører AMR gener til bakterien. Konjugasjon derimot, ser ut til å spille en større rolle for AMR spredningen. Flere studier har vist at konjugasjon mellom bakterier som har stor taksonomisk avstand kan foregå i betydelig grad (Norman et al., 2009; Tao et al., 2022). HGO kan forekomme i alle miljøer, og særlig i områder hvor bakterieantallet er stort, eksempelvis i renseanlegg, i jord eller i tarmmikrobiomet til mennesker og dyr. I slike miljøer vil det i stor grad kunne utveksles AMR gener via plasmider (Tao et al., 2022).



Figur 2 Illustrerer horisontal genoverføring ved transformasjon, transduksjon og konjugasjon (Furuya & Lowy, 2006).

### 1.1.2 Plasmider

Plasmider er mobile genetiske elementer som består av sirkulært dobbelt-trådet DNA som er ekstrakromosomt. Plasmider er ikke livsviktige for verten, men genene på plasmidet kan være til fordel for verten ved ulike forhold. Ofte koder plasmider for gener som er involvert i virulens, avgiftning, økologiske interaksjoner (eksempelvis konkurranse, predasjon og mutualisme) og AMR (Smillie et al., 2010). Overføring og spredning av plasmider gjennom konjugasjon er en viktig rute for utvikling og spredning av AMR mellom ulike bakterier. Ulike plasmider kan inneholde flere resistensgener som gir resistens mot flere klinisk viktige antibiotika samtidig (Li et al., 2019; Johnson et al., 2012). Plasmider kan identifiseres og karakteriseres utfra hvilken inkompatibilitetsgruppe (Inc-gruppe) de tilhører. Innen bakteriegruppen *Enterobacterales* er det frem til i dag blitt registrert minst 27 ulike Inc-grupper av plasmider. Plasmider som tilhører samme Inc-gruppe kan ikke sameksistere i den samme bakterien og heller ikke overføres sammen til en annen bakterie. Grunnen er at plasmider som tilhører samme Inc-gruppe har samme replikasjonsmekanisme (Puangseree et al., 2022). IncK og Inc11 er blant Inc-gruppene som oftest forekommer hos *Enterobacterales* og resistensgenet *bla<sub>CMY-2</sub>* har blitt funnet i begge disse. Slike konjugative plasmider med *bla<sub>CMY-2</sub>* er ofte assosiert med eksternt spektrum

cefalosporin-resistente (ESC-resistente) *E. coli* stammer fra norsk slaktekyllingproduksjon (Mo et al., 2017; Mo et al., 2016).

## 1.2 Cefalosporin-resistens hos *E. coli*

Cefalosporiner er en type  $\beta$ -laktamantibiotika som interfererer med celleveggsyntesen til bakterien. Cefalosporiner kan deles inn i generasjoner, som baserer seg på den antimikrobielle effekten mot Gram-positive og Gram-negative bakterier, i tillegg til den rekkefølgen de ble oppdaget og tatt i bruk til medisinske formål (Bui & Preuss, 2022). Tredje- og fjerdegenerasjons cefalosporiner har mest uttalt effekt mot Gram-negative bakterier, og klassifiseres som klinisk viktige bredspektra antibiotika (Zamudio et al., 2022). Innen tredjegerasjon finnes blant annet cefotaksim og ceftazidim, og innen fjerdegenerasjon finnes cefepim, cefixim og cefiderokol (Legemiddelhandbok, 2022). En fellesbetegnelse for alle disse er ekstendert spektrum cefalosporiner (ESC). Helt siden ESC ble tatt i bruk, har AMR mot disse økt betraktelig på et globalt nivå. Særlig gjelder dette Gram-negative bakterier som tilhører familien *Enterobacterales* som omfatter flere klinisk viktige og potensielt patogene bakterier. Disse inkluderer blant annet *E. coli*, *Salmonella spp.* og *Klebsiella spp.* Det er blitt påvist cefalosporin-resistens innen *Enterobacterales* fra både mennesker og dyr. Denne resistensegenskapen kommer oftest som følge av to hovedgrupper av inaktiverende enzymer; ekstendert spektrum  $\beta$ -laktamaser (ESBL) og AmpC  $\beta$ -laktamaser (AmpC) (Zamudio et al., 2022).

### 1.2.1 AmpC $\beta$ -laktamaser

AmpC er en gruppe enzymer som hydrolyserer tredjegerasjons cefalosporiner, monobaktamer og cephamyciner (Philippon et al., 2002). Hydrolysen fører til at  $\beta$ -laktamet inaktiveres. Det finnes både kromosomal AmpC og plasmid-mediert AmpC (pAmpC). Hos *E. coli* kan cefalosporin-resistens som følge av produksjon av AmpC  $\beta$ -laktamaser forekomme som et resultat av oppregulering av det kromosomale *ampC* genet ved mutasjoner i promoter/attenuator-regionen, eller gjennom ervervelse av plasmid-bærende *bla*<sub>Amp-C</sub> gener (Jacoby, 2009; Philippon et al., 2002; Pfeifer et al., 2010). Kromosomal AmpC er en naturlig iboende egenskap, mens pAmpC derimot er overførbare plasmider som inneholder gener for AmpC- $\beta$ -laktamaser og er dermed mer bekymringsverdige med henhold til spredning av cefalosporin-resistens (Jacoby, 2009). De ulike pAmpC  $\beta$ -laktamasene kan deles inn i grupper,



og globalt er CMY den vanligste gruppen, med CMY-2 som vanligste undergruppe (Jacoby, 2009; Koga et al., 2019). I Norge har CMY-2 oftest blitt påvist hos cefalosporin-resistente *E. coli* i slaktekyllingsproduksjonen (Mo et al., 2014). Genet som koder for CMY-2 er *bla<sub>CMY-2</sub>* og dette genet har sitt opphav fra kromosomet til bakterien *Citrobacter freundii* (Carattoli, 2009; Koga et al., 2019). Spredning av AMR i form av pAmpC-  $\beta$ -laktamaser er et problem i miljøer der *E. coli* og andre *Enterobacterales* lever (Koga et al., 2019; Winøkur et al., 2001).

### 1.3 AMR i miljøet

Det er kjent at AMR er et globalt problem som følge av overbruk og misbruk. Frem til nå har det vært mye fokus på utvikling og spredning av AMR hos mennesker og dyr. Utbredelsen av AMR i det ytre miljø har ikke fått den samme oppmerksomheten tidligere, men viktigheten av dette har stadig blitt mer kjent. AMR bakterier og deres gener kan spres mellom mennesker og dyr i matproduksjonskjeden, og videre til miljøet. Det er blitt vist at en stor mengde av resistensgener som er assosiert med sykdom hos mennesker, har sitt opphav fra det ytre miljøet (Braykov et al., 2016).

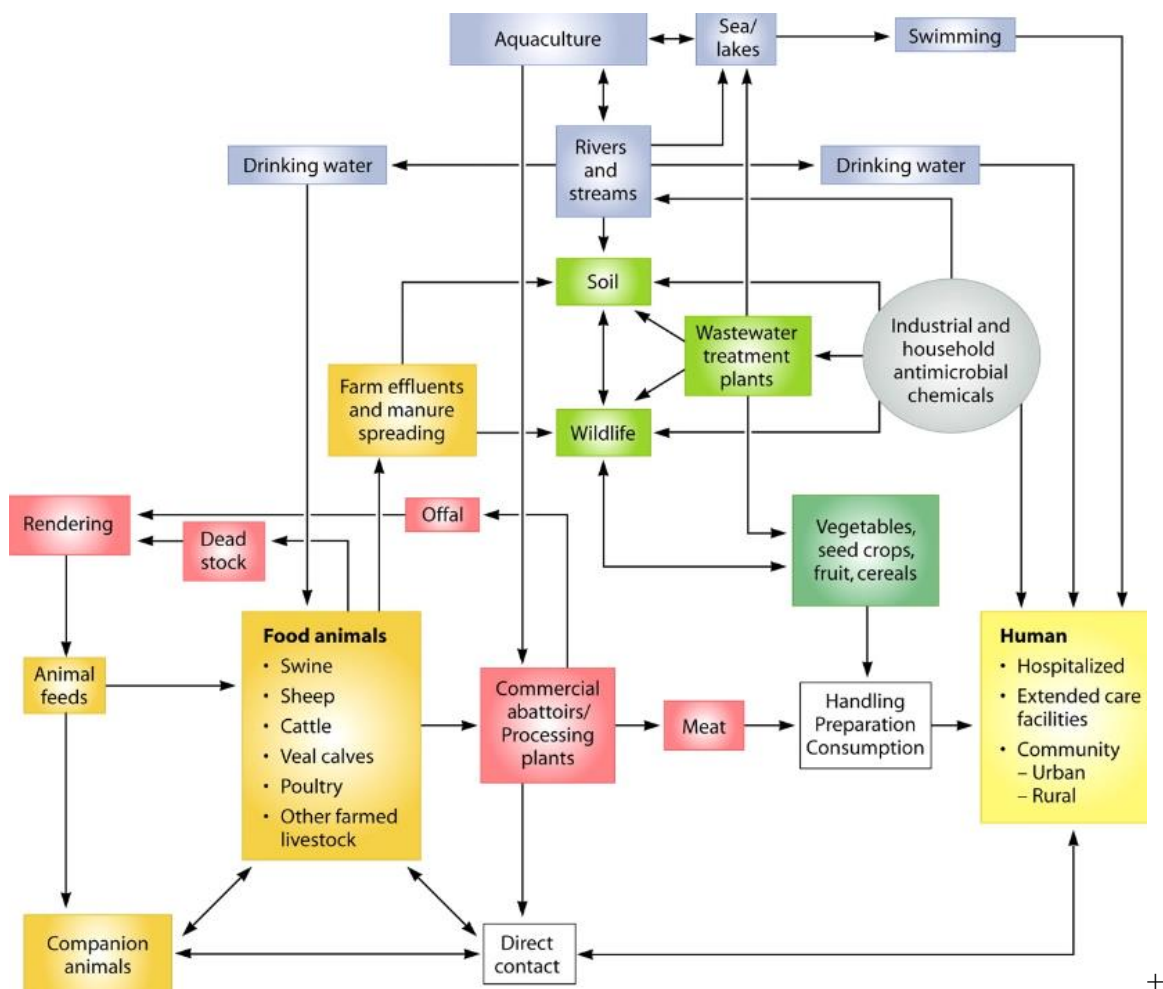
Det vil være essensielt å bryte spredningsveier mellom mennesker, dyr og det ytre miljø gjennom å forhindre at resistente bakterier inngår i økologiske kretsløp (Singer et al., 2016). Spredning av AMR i miljøet er svært komplekst, og det er derfor utfordrende å forske på dette (UNEP, 2023).

Bakterier som lever naturlig i jord og vann kan erverve AMR som følge av kontakt med resistente bakterier i disse matriksene. De resistente bakteriene i det naturlige miljøet kan ha fått denne egenskapen gjennom evolusjon, eller ved å ha blitt introdusert gjennom ekskrementer fra mennesker eller dyr. AMR hos bakterier øker med eksponeringen mot antibiotika, noe som i sin tur resulterer i et økt seleksjonspress. Bakterier har også veldig kort generasjonstid og derfor erverver de nye egenskaper fortløpende. Når antibiotika og antibiotikarester slippes ut i miljøet gjennom ulike former for menneskelig aktivitet, kontaminert jord og vann eller dårlige sanitærforhold, vil dette føre til at de naturlige bakteriesamfunnene i større grad kommer i kontakt med antibiotika og en økt forekomst av AMR vil oppstå (UNEP, 2023).

Det frigjøres store mengder AMR bakterier fra kilder som blant annet kloakk, avløpsanlegg, gjødsel og landbruksavrenning ut i det naturlige miljøet (VKM, 2022). Spredningsveier som

disse kan spille en viktig rolle i utviklingen og overføringen av AMR (Fletcher, 2015). Spredningsveiene til AMR er mange, og det er et komplekst kretsløp som består av en rekke ulike faktorer. De naturlige delene av dette kretsløpet påvirkes i stor grad av menneskeskapt aktivitet. Spredningen påvirkes også i betydelig grad av bakteriene sin evne til å overleve i ulike miljøer og deres naturlige evolusjonsprosesser (Francino, 2012).

Figur 3 under viser en oversikt over mulige ruter for spredning av AMR bakterier, eksempelvis cefalosporin-resistente *E. coli*, mellom ulike populasjoner og miljøer (Davies & Davies, 2010).



Figur 3 Illustrerer mulige spredningsveier for AMR bakterier og antibiotika mellom ulike populasjoner og miljøer, inkludert landbruk, avløpsvann, akvakultur, sykehus og ulike menneskelige samfunn (Davies & Davies, 2010).

### 1.3.1 Hvordan AMR sprer seg via vannsystemer

Overflatevann, grunnvann, avløpsvann, og vanningsvann er alle viktige spredningsveier for AMR til det ytre miljø (VKM, 2020; Waseem et al., 2017) .

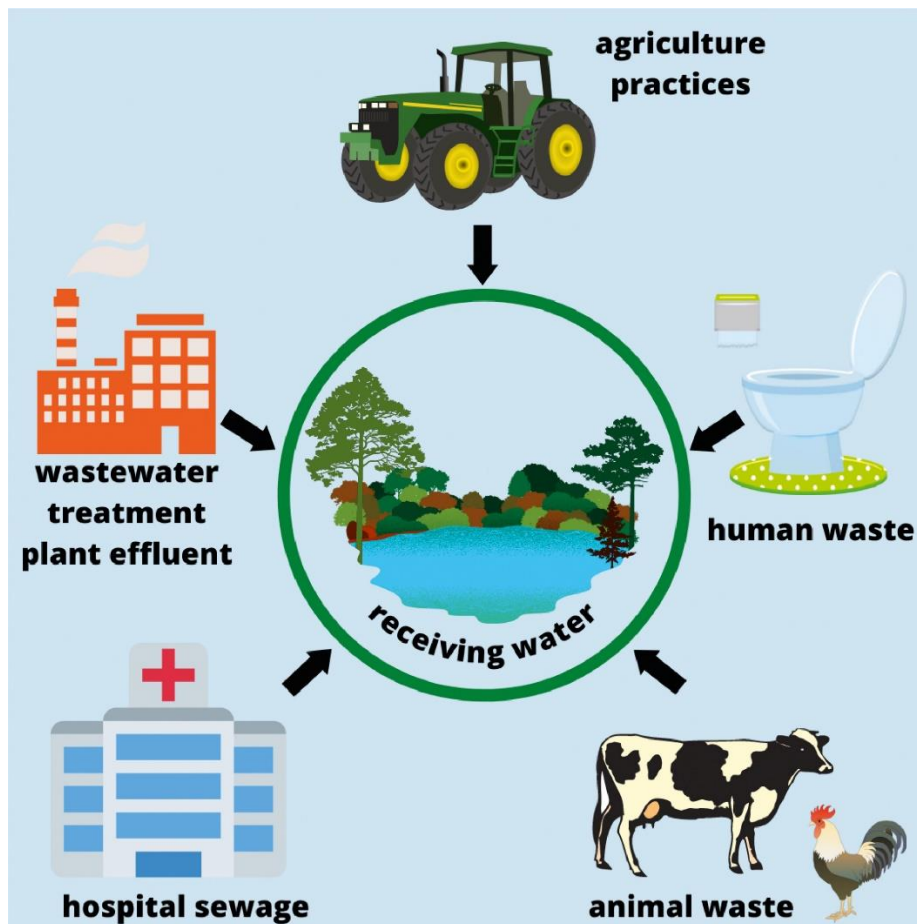
For eksempel vil AMR bakterier og rester av antibiotiske stoffer fra mennesker, som får antibiotikabehandling, bli transportert til det ytre miljø via kloakksystemet og eventuelt gjennom renseanlegg. Renseanlegg produserer avløpsvann og slam som slippes ut i vannmiljøet og har ikke renseprosesser for å hindre spredning av bakterier. Utslippet kan nå grunnvann og overflatevann som begge er viktige kilder til drikkevann (Waseem et al., 2017; VKM, 2020).

Det er dokumentert at AMR bakterier og antibiotikarester kan overleve kloakkrensing. Siden utslippet ofte ender i elver og innsjøer kan AMR bakterier spres i disse miljøene (VKM, 2020). Dette vil være spesielt bekymringsfullt for utslipp og avløpsrenseanlegg tilknyttet store byer. Her vil det forekomme en høy tetthet av ulike bakteriepopulasjoner og det vil være en betydelig forurensing med både bakterier og antibiotika (Waseem et al., 2017).

I både menneskepåvirkede og naturlige livsmiljø er det blitt detektert både resistente og multiresistente patogene bakterier (Kümmerer, 2003). I avløpsvann blandes flere forskjellige mikroorganismer, og her vil det kunne være høye konsentrasjoner av antibiotika, noe som medfører et høyt seleksjonspress (Waseem et al., 2017).

En annen kilde til spredning av AMR til miljøet er vanningsvann. Når det gjelder overføring av AMR til plantebasert mat, vil spesielt vanningsvannet være en viktig kilde til forurensing (Koutsoumanis et al., 2021). I enkelte deler av verden benyttes gjenvunnet avløpsvann fra kommunal kloakk til vanning. Dersom kvaliteten på vanningsvannet er dårlig, vil det derfor øke risikoen for kontaminering med AMR- bakterier og -gener. I tillegg kan innsjøer/vannmiljøer som ligger nær gjødslede landbruksarealer bli kontaminert med AMR bakterier via avrenning (FAO & WHO, 2019).

En innsjø eller et havområde hvor det dumpes avløpsvann eller kloakk som inneholder rester av antibiotika og/eller AMR bakterier vil kunne føre til kontaminering av akvatiske organismer som fisk og skalldyr etc. Humant konsum av sjømat kan dermed også føre til inntak av AMR bakterier, dersom denne ikke behandles riktig før den spises (FAO & WHO, 2019).



Figur 4 Illustrerer mulige kontamineringskilder for AMR til naturlige vannmiljøer. Dette inkluderer fekal kontaminering fra mennesker og dyr (Alawi et al., 2022).

### 1.3.2 Hvordan AMR sprer seg via gjødsling og jord

I husdyrproduksjonen benyttes antibiotika til ulike formål. I Norge er antibiotikabruken til husdyr svært lav og synkende, sammenlignet med mange andre land (NORM/NORM-VET, 2021). I visse andre land derimot, benyttes antibiotika ikke bare til terapeutisk formål, men også til å fremme vekst og forebygge sykdom hos produksjonsdyrene, som tidligere nevnt (WEF, 2017; Oliveira et al., 2020). Dette er i stor grad med på å øke seleksjonspresset, og dermed utvikling og spredning av AMR. Avløp med sin opprinnelse fra denne typen husdyrproduksjon kan derfor opptre som en viktig kilde for spredning av AMR til miljøet (Oliveira et al., 2020).

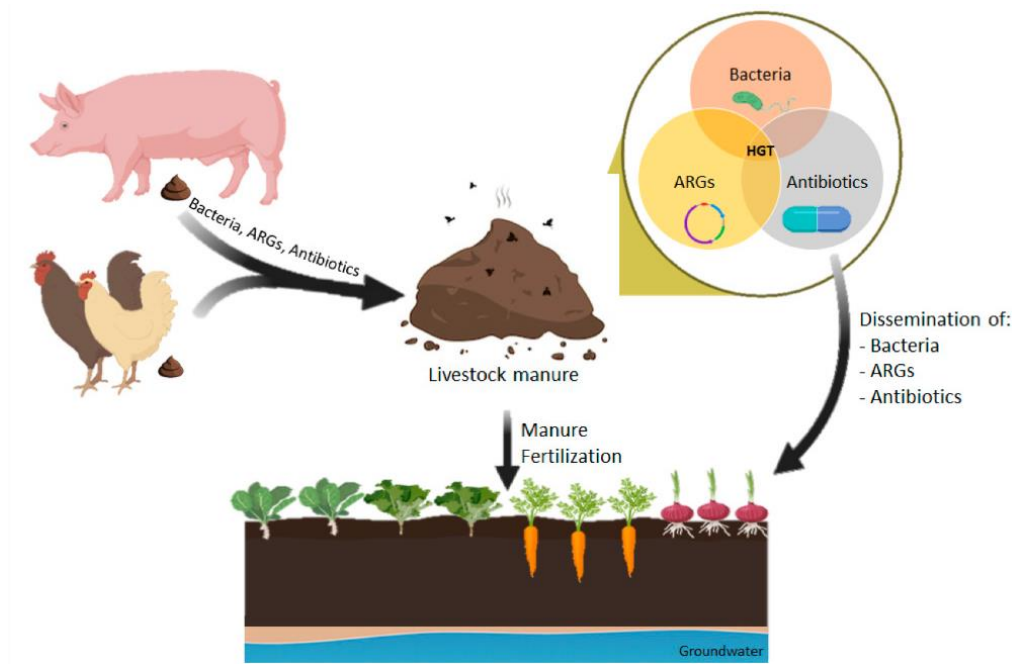
Slam som kommer fra avløpsrensaneanlegg kan brukes som jordforbedringsmiddel og plantegjødsel (VKM, 2020). Husdyrgjødsel er en viktig kilde og overføringsvei av AMR til plantebasert mat (Koutsoumanis et al., 2021). Behandling av dyr med antibiotika, uavhengig av

formål, vil også kunne medføre at antibiotikarester havner i gjødslet (Kümmerer, 2003). Gjødsling av jordbruksjord, vil kunne medføre kontaminering av ulike grønnsaker som igjen kan ende opp i tarmen hos mennesker eller dyr. AMR bakterier som spres i dyrkbar jord gjennom gjødsel kan altså resirkuleres gjennom matproduksjonskjedene (VKM, 2020). Spesielt er dette en risiko dersom plantekosten inntas rå, uten varmebehandling eller annen form for bakteriereduserende behandling. I Norge er det lite sannsynlig at dette er et problem, da husdyr i liten grad behandles med antibiotika (NORM/NORM-VET, 2021).

I rapporten til FAO & WHO (2019), er det tydelig konstatert at det finnes mye forskning som underbygger at plantebasert mat kan fungere som vektorer i overføringen av AMR bakterier. De forklarer at frukt, grønnsaker og annen plantebasert mat kan kontamineres med AMR-bakterier og -gener i alle de ulike stegene i matproduksjonskjeden. De viktigste årsakene til slik kontaminering av plantematen skjer gjerne før den høstes, og det inkluderer jorden den vokser i, gjødselen som tilføres og vanningsvannet som benyttes.

Den økende etterspørselen etter kjøtt og andre animalske produkter har ført til husdyravl i stor skala over store deler av verden. Dette resulter videre i at det produseres store mengder husdyrgjødsel. Gjødselen kan inneholde antibiotika-rester som fremdeles er i sin aktive form, uten å ha blitt fullstendig nedbrutt. Mer enn 80% av antibiotika som skilles ut via avføring eller urin er fremdeles i en aktiv form og ikke fullstendig metabolisert (FAO & WHO, 2019) . Når gjødselen benyttes til ulike formål i landbruket, vil dette medføre at mikrober som finnes naturlig i dette ytre miljøet får en større eksponering for antibiotika. Husdyrgjødsel vil ikke bare fungere som et reservoar for antibiotikarester, men også for AMR bakterier og deres gener (Lima et al., 2020). Når gjødsel tilsettes jord, blir dette et område hvor spredning av AMR kan finne sted gjennom HGO (Riber et al., 2014). Jorden, sammen med gjødselen er rike på næringsstoffer og det vil finnes et bredt spekter av ulike bakteriepopulasjoner i disse matriksene. HGO vil i stor grad kunne skje, i tillegg til at en potensiell opphopning av antibiotikarester fra gjødsel vil kunne resultere i økt seleksjonspress (Lima et al., 2020).

Jord- og vannmiljøer er ikke separate systemer. Jord og vann utgjør i praksis ulike deler av det naturlige miljøet og påvirker hverandre gjensidig. Gjødsling av landbruksjord kan for eksempel resultere i spredning av antibiotika og AMR bakterier gjennom avrenning til nærmeste overflatevann. Det er heller ikke uvanlig at overflatevann brukes til vanning i planteproduksjonen og produktene kan igjen konsumeres av både mennesker og dyr.



Figur 5 Spredning av AMR i forbindelse med gjødsling av landbruksjord (Lima et al., 2020).

### 1.3.3 Persistens

Persistens kan ha flere betydninger, men i denne oppgaven handler persistens om i hvilken grad AMR bakterier evner å overleve i jord og vann under stabile forhold og hvilke faktorer som påvirker denne overlevelsesraten (van Elsas et al., 2011).

Det er flere faktorer som kan bidra til persistensen av AMR bakterier i ulike miljøer. Eksempelvis vil persistensen i matproduserende miljøer kunne påvirkes av det selektive trykket i dyre- og miljømikrobiomer. Dette som følge av tilførsel av ulike antimikrobielle stoffer, biocider eller tungmetaller. I tillegg vil persistensen påvirkes av den kontinuerlige utvekslingen av bakterier mellom dyr og deres livsmiljøer. Persistensen av AMR bakterier vil også påvirkes av de aktuelle bakterienes egenskaper, som konkurransekraft, stressresponsevne og biofilmdannelse (Koutsoumanis et al., 2021). Når det kommer til *E. coli* som generelt er en relativt motstandsdyktig bakteriegruppe ved overlevelse i ulike miljøer, varierer graden av persistens mellom ulike stammer. Noen *E. coli* stammer kan produsere filamentøse strukturer ut fra cellene som dermed gjør at de kan feste seg til overflater. Som følge av denne egenskapen kan patogene *E. coli* stammer som kommer fra blant annet gjødsel, jord eller vanningsvann, kontaminere grønnsaker og feste seg her. En annen essensiell egenskap for å kunne persistere bedre i ulike miljøer er bakteriens evne til å tilegne seg næringsstoffer (van Elsas et al., 2011).

## 1.4 Betydning for folkehelse

Økning i AMR mot kritisk viktige antibiotika er et alvorlig problem som truer folkehelsen. Uten funksjonelle antibiotika vil et bredt spekter av medisinske behandlinger som eksempelvis kirurgi, kreftbehandlinger og nyfødtsmedisin kunne bli vanskelige eller umulige å gjennomføre. Antibiotika er en grunnmur i moderne medisin og AMR har derfor stort potensiale til å sette helsevesenet tilbake. I Norge er resistensproblemet mindre enn i mange andre deler av verden, men det er et økende problem også her. Det at verden har blitt mer globalisert med mye import og eksport mellom ulike land resulterer i økt spredning og høyere forekomst av AMR bakterier globalt. Bakterier blir blant annet fraktet mellom landegrensene via dyr, mennesker, planter og matvarer (Steinbakk et al., 2014). Sykdom som følge av resistente bakterier fordobler sannsynligheten for at sykdommen medfører et alvorlig helseproblem og sannsynligheten for fatalt utfall vil tredobles, sammenlignet med sykdom forårsaket av ikke-resistente bakterier. Det er estimert at ca. 700 000 mennesker i verden dør av resistente bakterier hvert år (Dadgostar, 2019). Den årlige dødsraten i Europa er estimert til 25 000 mennesker hvert år. Dersom det ikke blir satt i gang mer omfattende tiltak for å hindre den negative utviklingen av AMR globalt, er det som tidligere nevnt estimert at ca. 10 millioner mennesker vil dø av dette innen år 2050 (Dadgostar, 2019).

Det blir stadig påvist AMR blant bakterier som til vanlig kan medføre urinveisinfeksjoner, sår infeksjoner, sepsis og pneumoni. Dette inkluderer bakterier som *E. coli*, *S. aureus* og *Klebsiella pneumoniae* (Fletcher, 2015).

Mennesker og dyr eksponeres for AMR bakterier og deres AMR gener i stor grad, da de finnes rundt oss overalt, i ulike miljøer. Vi kommer både i kontakt med patogene- og ikke-patogene bakterier, ofte ved inntak gjennom mat og drikke. Når AMR bakteriene når tarmen hos dyr eller mennesker vil AMR genene kunne utveksles til andre bakterier som allerede lever i tarmen og som er del av vertens normale bakterieflora. Flere studier har også vist at spredningen av AMR gener via HGO forekommer i tarmen hos mennesker og dyr (Knudsen et al., 2018). For eksempel ble det vist i en studie som brukte en «in situ» tarm-modell at overføring av AMR-plasmider fra *E. coli* hentet fra fjørfe, kunne overføres til *E. coli* i tarmen. Det kan indikere at det også kan skje i mennesketarm (Smet et al., 2011).



I tillegg kan AMR gener i verste fall overføres til andre patogene bakterier. Ved en eventuell antibiotikabehandling hos verten, vil det kunne selekteres for AMR bakterier i tarmen (Davies & Davies, 2010; Steinbakk et al., 2014). I en tidligere studie ble det vist at bare rundt 15% av infeksjoner hos pasienter med intensivbehandling i Europa skyldes kryss-smitte mellom personer. Derfor antas det at resten av slike infeksjoner skyldes mikrober pasienten selv hadde med seg før innleggelse på sykehus, eller som pasienten hadde fått i seg gjennom inntak av mat og drikke etter innleggelse. Viktigheten av å opprettholde et lavt nivå av AMR i miljøet er derfor svært høy (Grundmann et al., 2005; Steinbakk et al., 2014).

### 1.5 Forebyggende tiltak og kunnskapshull

Det blir stadig rettet mer fokus mot viktigheten av å kartlegge AMR i miljøet, som et ledd i å forebygge risiko for menneskers helse og å lære mer om hvor stor rolle miljøet har når det kommer til spredning av AMR (Williams et al., 2016).

For å kunne redusere spredningen av AMR, er det nødvendig med handlingsplaner som inkluderer det ytre miljø. Overvåkningssystemer for AMR hos mennesker, dyr, næringsmidler og fôr har allerede vært etablert i lang tid. Tilsvarende overvåkningssystem finnes derimot ikke for store deler av det ytre miljø. Nåværende kunnskap om AMR i miljøet er basert på relativt lite forskning, sammenlignet med de andre kategoriene. Det er gjennomført miljøstudier, men de er ofte basert på lite systematisk prøvetaking og viser dermed kun et snevert bilde av hvordan tilstanden er lokalt og i øyeblikket (VKM, 2022). I flere av disse studiene er det blitt tatt i bruk svært forskjellige metoder, noe som gjør det krevende å sammenligne resultatene på tvers av studiene. Det trengs altså mer standardiserte analysemetoder til påvisning av AMR i miljøet (VKM, 2022).

Kartlegging av AMR relatert til menneske- og dyrehelse, samt det ytre miljø, bør koordineres og metodikken standardiseres så langt det lar seg gjøre (Kümmerer, 2003). I den nyeste rapporten til Vitenskapskomiteen for mat og miljø (VKM) fra 2022, vurderes grunnlaget for å opprette et overvåkingssystem for AMR i miljøet, såkalt NORM-ECO, tilsvarende de allerede etablerte overvåkingssystemene NORM og NORM-VET. Disse er basert på «Én helse-tilnærmingen» i regi av WHO (Mackenzie & Jeggo, 2019; Lima et al., 2020; VKM, 2022). I rapporten til VKM (2022) konkluderer de altså med at det er tydelige behov for mer kunnskap om AMR i miljøet og risikoen knyttet til det. I tillegg legger de vekt på viktigheten av å etablere



prøvetakingsrutiner i ulike deler det ytre miljøet, som akvatiske systemer og jordbruksland, samt beiteområder for husdyr og ville dyr.

Det er behov for mer kunnskap om AMR i miljøet og mulig risiko dette medfører (VKM, 2022). Kunnskapen rundt hvilken rolle miljødynamikken (kompleksiteten i og mellom naturlige og menneskeskapt systemer) har i utviklingen og spredningen av AMR er mangelfull. Det er behov for å forstå miljøfaktorene som bidrar til utviklingen og opprettholdelsen av resistente patogener og ikke-patogene bakterier, for å redusere ytterligere spredning av AMR i miljøet (Fletcher, 2015).

Singer et al. (2016) beskriver at det fremdeles er store kunnskapshull og mange spørsmål som trengs å bli besvart for å kunne iverksette en helhetlig tiltaksplan i kampen mot spredningen av AMR. Det trengs mer kunnskap om prosesser og i hvilken grad utslippene av antibiotika, AMR-bakterier og -gener bidrar til spredningen av AMR i miljøet. I tillegg trengs det svar på hvor stor nytteverdi en eventuell kontroll av AMR i miljøet vil ha. Er det for eksempel teknisk mulig og økonomisk forsvarlig å begrense overføring av AMR fra miljøet til mennesker signifikant? En annen usikkerhet er hvor godt dagens teknologier og tilnærminger begrenser denne spredningen. Hva vil effekten være av å regulere nåværende forurensningskilder for AMR til miljøet og hvor mye kan man oppnå gjennom samfunnsmessige reguleringer (Singer et al., 2016)?

I den siste årsrapporten til VKM (2022), nevnes blant annet manglende kunnskap om AMR i miljøer som tidligere ikke har vært eksponert for antibiotika. Det er også fokus på hvordan AMR varierer geografisk og over tid. Frem til i dag er det en overvekt av studier og data rettet mot AMR i menneskelige patogener og modellorganismer. Derfor vet vi mindre om de resterende mikrobielle samfunnene. Det er også manglende kunnskap om hvordan naturlige mikrobefunn kan dyrkes under laboratoriebetingelser.

Generelt trengs det mer kunnskap om forekomst av AMR hos bakterier som finnes i tarmfloraen til mennesker og dyr, og tilsvarende for mikrober i jord og vann (Steinbakk et al., 2014). Til tross for de mange mulige spredningsveiene av antibiotika og AMR fra mennesker og dyr til miljøet som er kjent, vet vi fortsatt lite om hvilke konsekvenser denne spredningen til miljøet faktisk medfører (Kümmerer, 2003; Steinbakk et al., 2014).

## 1.6 Målet med forsøkene og forskningsspørsmål

Det overordnede målet med arbeidet er at resultatene kan bidra til økt kunnskap om faktorer som påvirker persistens hos cefalosporin-resistente *E. coli*, og overføring av AMR-plasmider i miljøet. I tillegg kan resultatene fra oppgaven bidra som et grunnlag for videre forskning som har som mål å medvirke til forbedring av rutiner og forebyggende tiltak mot spredning.

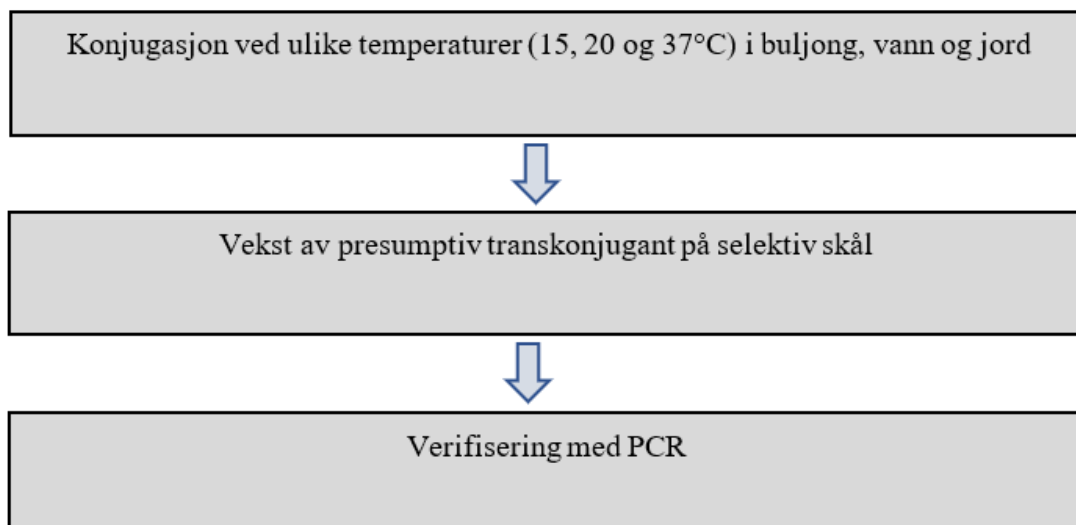
Målet med denne oppgaven var å undersøke hvordan to ulike cefalosporin-resistente *E. coli* stammer persisterte og deres AMR-plasmider konjugerte i jord og vann ved en representativ norsk sommertemperatur (15 °C). Evnen til å persistere ble undersøkt i tilnærmet naturlige bakteriesamfunn (ikke-autoklavert matriks) og i renkulturer (autoklavert matriks). I tillegg ble bakterienes evne til å overføre resistensplasmidene sine undersøkt i jord og vann, autoklavert og ikke-autoklavert matriks, og ved tre forskjellige temperaturer.

Følgende forskningsspørsmål ble forsøkt besvart:

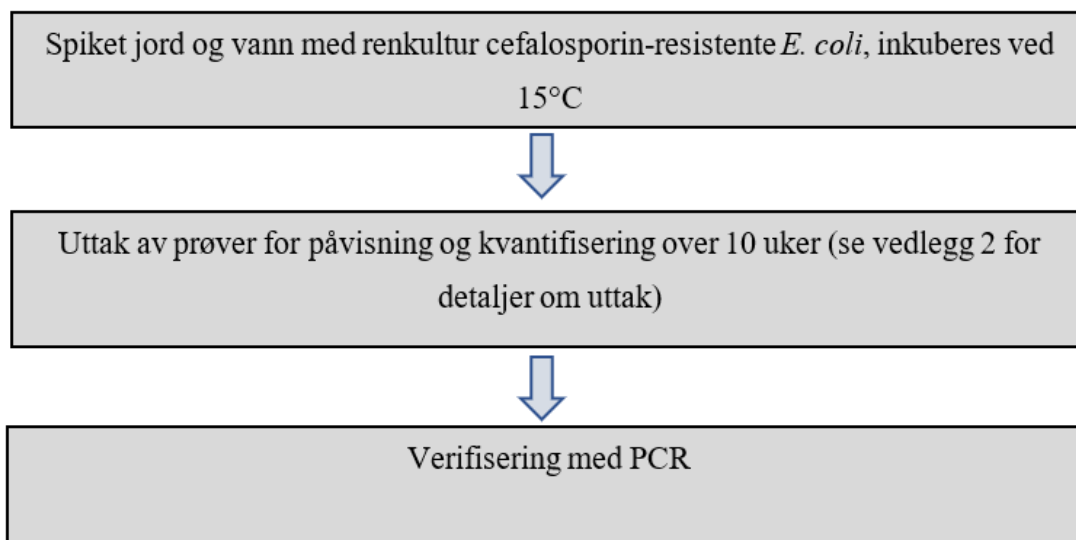
- Kan cefaloporin-resistente *E. coli* overføre AMR-plasmidene sine videre til andre *E. coli* i jord og vann gjennom konjugasjon?
- Kan cefalosporin-resistente *E. coli* overleve/persistere i jord/vann over tid og i så fall hvor lenge?
- Hvordan påvirker temperatur konjugasjonen?
- Kan temperatur og matriks påvirke spredningen av AMR-plasmider i miljøet?

## 2 MATERIALE OG METODER

I denne oppgaven er det utført eksperimenter med genoverføring og persistens hos *E. coli*. Det ble gjort konjugasjonsforsøk i buljong, vann og jord. Genoverføring fra donor til resipient ble verifisert ved bruk av konvensjonell PCR (fylotyping) og real-time PCR (påvisning av *bla<sub>CMY-2</sub>*). Persistens ble registrert ved utsæd og kolonitelling på selektive agarskåler over en valgt tidsperiode. Utvalgte kolonier ble verifisert ved MALDI-TOF, real-time PCR og konvensjonell PCR. Gangen i metodene er visualisert i Figur 6 og Figur 7.



Figur 6 Flytskjema for metoder brukt i konjugasjonsforsøkene.



Figur 7 Flytskjema for metoder brukt i persistensforsøkene i en periode på 10 uker.

## 2.1 Bakteriestammer

*E. coli* stammene benyttet i forsøkene var to cefalosporin-resistente donorstammer og en kinolon-resistent resipientstamme.

Alle bakteriestammene (donorstammer og resipientstamme) kommer fra Veterinærinstituttet (VI), og var isolert i overvåkningsprogrammet NORM/NORM-VET i 2012 (NORM/NORM-VET, 2012).

Donorstammene; 2012-01-1292 og 2012-01-2798 (heretter kalt D1292 og D2798) ble begge isolert fra kyllingkjøtt. Til dette ble det brukt selektiv metode ved at kyllingkjøttet ble inkubert i buljong, etterfulgt av utsåing på selektive MacConkey (MC) agarskåler med 1 mg/L cefotaksim (MC-cefo) og MC med 2 mg/L ceftazidime. Målet med dette var å selektivt dyrke frem cefalosporin-resistente *E. coli*. Begge isolatene D1292 og D2798 er cefalosporin-resistente da de inneholder genet *bla<sub>CMY-2</sub>* som koder for denne egenskapen (NORM/NORM-VET, 2012).

Resipientstammen; 2012-01-6927-5 (heretter kalt resipienten, eller forkortet som R) ble isolert fra blindtarm hos slaktekylling, og er hentet fra MC agarskål uten tilsatt antibiotika. Resipienten er en indikator *E. coli* som er kinolon-resistent. Dette er fordelaktig ved at det utfra dette kan selekteres for både kinolon- og cefalosporin-resistente transkonjuganter (Mo et al., 2017).

Donor- og resipientstammene hadde i en tidligere studie blitt screenet for Inc11 og IncK plasmider, for å sikre at de ikke inneholdt plasmider fra samme Inc-gruppe, da dette ikke ville være hensiktsmessig. D1292 har genet *bla<sub>CMY-2</sub>* plassert på et IncK plasmid (pNVI1292/IncK), og D2798 har tilsvarende gen plassert på et Inc11 plasmid (pNVI2798/Inc11) (Mo et al., 2017; Mo et al., 2016).

Tabell 1 Bakteriestammene benyttet i forsøkene.

Donor/ resipient	Stamme- id	Bakteriestamme	Kilde	Plasmid	Fylotype	Resistens <sup>a</sup>	Referanse
<b>Donor</b>	(2012-01) 1292	<i>E. coli</i> , AmpC, bla <sub>CMY-2</sub>	Kyllingkjøtt (VI <sup>b</sup> )	pNVI1292/IncK	D	Ctx <sup>r</sup>	(Mo et al., 2016; Mo et al., 2017)
<b>Donor</b>	(2012-01) 2798	<i>E. coli</i> , AmpC, bla <sub>CMY-2</sub>	Kyllingkjøtt (VI)	pNVI2798/IncI1	A	Ctx <sup>r</sup>	(Mo et al., 2017)
<b>Resipient</b>	(2012-01) 6927-5	<i>E. coli</i>	Fekal flora fra slaktekylling, indikator (VI)	-	B1	Nal <sup>r</sup>	(Mo et al., 2017)

a: Ctx<sup>r</sup>, cefotaksim resistent; Nal<sup>r</sup>, nalidiksinsyre resistent

b: Veterinærinstituttet

## 2.2 Matriks

Vannet brukt i forsøkene ble hentet den 30. oktober 2022 i Årungen, som er en innsjø i Ås kommune. Deler av vannet ble autoklavert på 121 °C i 15 minutter hos seksjon for medieproduksjon og logistikk på VI. Jorden som ble brukt var plantejord kjøpt på Maxbo med innhold av torv, kompostert hestegjødsel, sand, kalkdolomitt og NPK-gjødsel m/mikronæring (Vedlegg 1). Deler av jorden ble autoklavert på et tørrautoklaveringsprogram ved 121 °C i 30 minutter hos seksjon for medieproduksjon og logistikk på VI. Det samme vannet og jorden (ikke-autoklavert og autoklavert) ble benyttet i konjugasjons- og persistensforsøkene.

## 2.3 Naturlig forekomst av *E. coli* i matriks

For å kunne utelukke naturlig forekomst av bakterier med samme resistensegenskaper som forsøksisolatene, ble begge matriksene screenet før forsøkene startet. MC (Becton Dickinson, BD) ble brukt for å selektere for *E. coli*. Dette er en type laktoseskål som selekterer for Gram-negative bakterier. *E. coli* skiller seg ut ved å danne rosa kolonier (se Figur 8) på denne agarskålen som et resultat av laktose fermentering (Jung & Hoilat, 2022). Skålene hadde også innhold av antibiotikatyperne cefotaksim (Sigma) og/eller nalidiksinsyre (Sigma) og formålet med dette var å avklare tilstedeværelse av cefalosporin-resistente *E. coli* og kinolon-resistente *E. coli*.



Figur 8 Vekst av cefalosporin-resistent *E. coli* på MC med 1 mg/L cefotaksim tilsatt. Bildet viser typisk *E. coli* morfologi med sterkt rosa kolonier og rosa fargeomslag i agarskålen.

### 2.3.1 Screening av vann fra Årungen

Autoklavert og ikke-autoklavert vann fra Årungen ble begge screenet for cefalosporin- og/eller kinolon-resistente *E. coli*. Vannet ble filtrert ved bruk av vakuumfiltrering med Millipore (0,45  $\mu\text{m}$  filter). Det ble gjennomført seks filtreringer med 100 ml per parallell. Filtrene ble lagt på midten av ulike selektive agarskåler. Dette inkluderte MC-cefo, MC med 0,5 mg/L cefotaksim og 20 mg/L nalidiksinsyre (MC-cefo+nal) og en MC hvor det ble lagt på en nalidiksinsyre-lapp (30 mcg, OXOID) midt på filteret. Skålene ble inkubert på  $37 \pm 1$  °C over natt. Alle mistenkelige kolonier ble rendyrket på hver sin MC for å undersøke typisk *E. coli* morfologi hos disse. De ble også undersøkt med indol-test (DrySlide Indole)(BD), en biokjemisk test som bestemmer bakteriens evne til å omdanne tryptofan til indol og er positiv ved rødt fargeomslag (Darkoh et al., 2015). *E. coli* er positiv på indol-test.

Kolonier med morfologi som lignet *E. coli* på MC, men som hadde negativt utslag på indol, ble i tillegg undersøkt med Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF).

### 2.3.2 Screening av plantejord

Siden jord kan inneholde en rekke ukjente bakterietyper ble den screenet for naturlig forekomst av cefalosporin- og kinolon-resistente *E. coli*. Både autoklavert og ikke-autoklavert jord ble

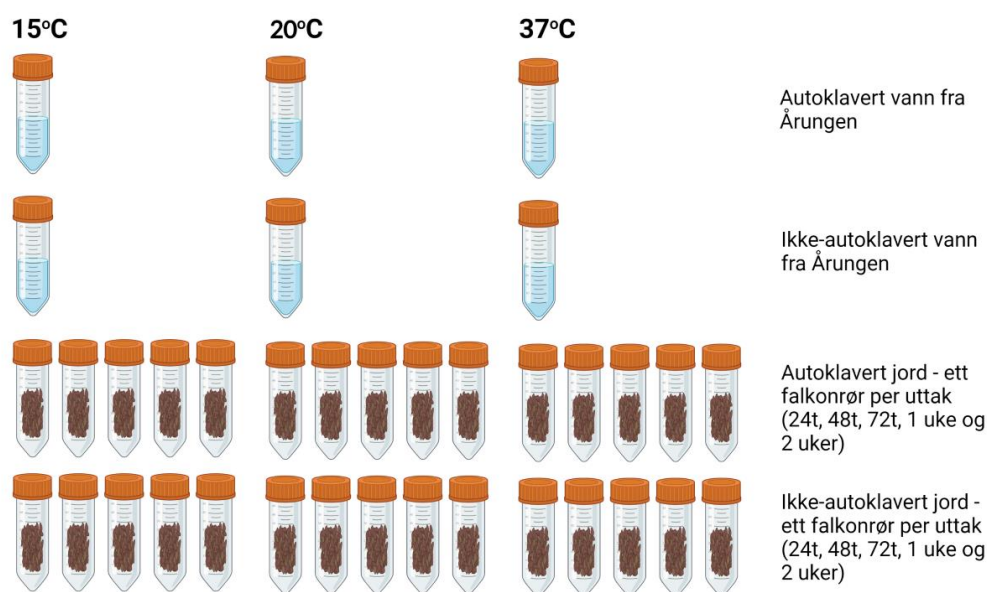
screenet. En mengde på 10 g av henholdsvis autoklavert og ikke-autoklavert jord ble veid opp i stomacherposer med filter (VWR Blender bag, Lateral filter, 400 ml, sterile, VWR European). Posene ble tilsatt 90 mL bufret peptonvann (BPV-ISO) (Oxoid CM) og ristet godt. Deretter ble det sådd ut 333  $\mu$ L fra filterdelen av posen på hver av tre MC-cefo i tillegg til 100  $\mu$ L direkte på én MC-cefo. Det ble laget en fortynningsrekke ved bruk av 9 mL BPV-ISO rør, og 100  $\mu$ L ble sådd ut på MC-cefo agarskåler fra  $10^{-2}$  og  $10^{-3}$  fortynningene. Alle agarskålene ble inkubert på  $37 \pm 1$  °C over natt, inkludert stomacherposene.

Neste dag ble det sådd ut på MC-cefo agarskåler direkte fra de oppformerte buljongene med 10  $\mu$ L podeøse og inkubert som beskrevet over.

Det ble utført enda en screening av autoklavert og ikke-autoklavert jord med en litt annen prosedyre. Det ble veid opp 10 g av henholdsvis autoklavert og ikke-autoklavert jord som ble blandet med 90 mL BPV-ISO i en stomacherpose og satt til oppformering på 37 °C over natt. Videre ble 333  $\mu$ L fra den oppformerte stomacherposen spredd på hver av tre MC agarskåler med en nalidiksinsyre-lapp på hver. Dette var for å avdekke om det fantes naturlige kinolon-resistente *E. coli* med samme egenskaper som resipienten som skulles benyttes i konjugasjonsforsøkene.

## 2.4 Konjugasjonsforsøk i buljong, vann og jord

Konjugasjonsforsøk i vann og jord ble utført først etter at det var verifisert at plasmidene kunne overføres i buljong (beskrevet under). Forsøket ble gjennomført i sterilt RO-vann (Produsert av NMBU), autoklavert vann og ikke-autoklavert vann fra Årungen. Det samme forsøket ble også gjennomført i autoklavert jord og ikke-autoklavert jord. Formålet var å undersøke om konjugasjon kunne skje i disse matriksene. Som forberedelse til alle konjugasjonsforsøk ble ca. 1  $\mu$ L podeøse av henholdsvis donorstammer og resipientstammen sådd ut i hvert sitt rør med 4 mL Luria-Bertani-buljong (LB-buljong) (Millipore/Merck). Hvert enkelt rør ble blandet godt og inkubert over natt på  $37 \pm 1$  °C. Disse overnatt-kulturene ble brukt til å lage matingene (nærmere forklart under). Selve konjugasjonsforsøkene i vann og jord ble utført ved 15, 20 og 37 °C. Presumptive transkonjuganter ble rendyrket på blodskål (Oxoid CM) og verifisert med PCR ved å detektere resistensgenet *bla<sub>CMY-2</sub>* og sikre at fylotypen var riktig. I tillegg ble atypiske kolonier rendyrket og undersøkt med MALDI-TOF og/eller PCR.



Figur 9 Illustrerer oppsettet til konjugasjonsforsøkene i vann og jord, figuren er laget i bioRender.com av veileder Solveig Sølvørød Mo.

#### 2.4.1 Innledende konjugasjonsforsøk i buljong

For å bekrefte evnen til plasmidoverføring fra donorene til resipienten, ble det innledningsvis utført et konjugeringsforsøk i LB-buljong (Mo et al., 2016). De tre stammene ble sådd ut på hver sin Mueller Hinton agarskål (BD) med innhold av 0,5 mg/L cefotaksim og 20 mg/L nalidiksinsyre (MH-cefo+nal) for å sikre at de ikke kunne vokse her. Både MH agarskåler og LB-buljong ble inkubert på  $37 \pm 1$  °C over natt.

Neste dag ble 1 mL overnatt-kultur fra resipient og 1 mL overnatt-kultur fra donor blandet sammen i 4 mL LB-buljong, slik at overføringen av plasmid fra donor til resipient kunne skje via direkte kontakt (heretter kalt mating). Det ble satt opp seks rør LB-buljonger til mating. Disse ble satt til inkubering ved temperaturene 15, 20 og  $37 \pm 1$  °C. Matingene som ble inkubert på  $37 \pm 1$  °C stod først i fire timer. Deretter ble 100 µL fra disse sådd ut på MH-cefo+nal agarskåler, før matingene og agarskålene ble inkubert videre på  $37 \pm 1$  °C over natt. Det ble tatt ut prøver av alle matingene som beskrevet over etter 4 t (bare for matingen på  $37 \pm 1$  °C), 24 t og 48 t, MH agarskålene ble inkubert ved  $37 \pm 1$  °C over natt.



Vekst på MH-cefo+nal agarskål indikerte sannsynlig positiv konjugasjon. Dersom det ikke ble observert vekst på MH agarskålen etter 48 timer, ble det sådd ut på ny MH-cefo+nal agarskål fra 72 timers mating.

#### 2.4.2 Konjugasjonsforsøk i sterilt RO-vann

RO-vann brukes i laboratorier fordi det har kjente egenskaper. Råvann filtreres for å fjerne farge, humus og lukt. Vannets hardhet er stabilisert med ionebytting. I tillegg steriliseres vannet ved hjelp av UV-stråling.

Det ble brukt samme prosedyre og materialer som ved konjugasjonsforsøk i buljong med unntak av at matingen ble laget ved å tilsette 10 mL sterilt RO-vann til falkonrør (50 mL, SARSTEDT, Germany) og 100 µL av henholdsvis donor- og resipientstamme fra den oppformerte LB-buljongen som hadde stått over natt. Matingen ble blandet godt. Falkonrørene ble inkubert på henholdsvis 15, 20 og  $37 \pm 1$  °C over natt. Etter 24 t ble 100 µL fra hver mating sådd ut på hver sin MH-cefo+nal agarskål og inkubert ved  $37 \pm 1$  °C over natt. Dersom det ikke ble observert vekst etter 24 t, ble det sådd ut etter 48 t, og videre etter 72 t dersom ingen vekst var observert etter 48 t.

#### 2.4.3 Konjugasjonsforsøk i vann fra Årungen

Det ble brukt samme prosedyre og materialer som ved konjugasjonsforsøk i buljong med unntak av at matingen ble laget ved å tilsette 19,6 mL av henholdsvis autoklavert og ikke-autoklavert vann til falkonrør og 200 µL av henholdsvis donor- og resipientstamme. Matingene ble blandet godt og inkubert på 15, 20 og  $37 \pm 1$  °C over natt. Etter 24 t ble 100 µL fra rørene sådd ut på MC-cefo+nal agarskål og inkubert ved  $37 \pm 1$  °C over natt. Dersom det ikke ble observert vekst etter 24 t, ble det sådd ut etter 48 t, og videre etter 72 t dersom ingen vekst var observert etter 48 t. Det ble også sådd ut på MC agarskål etter at det hadde gått én og to uker fra matingen ble laget, for å undersøke om konjugasjon kunne foregå etter lengre tid. Etter to uker ble matingen også filtrert, og filtrene ble lagt på MC-cefo+nal agarskål og inkubert på  $37 \pm 1$  °C over natt.

#### 2.4.4 Konjugasjonsforsøk i plantejord

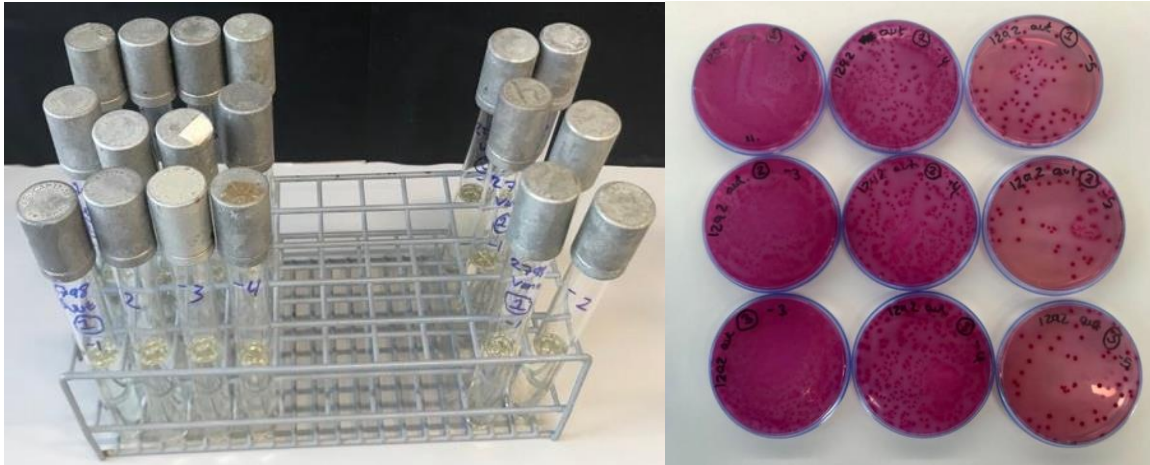
Ti gram av henholdsvis autoklavert plantejord og ikke-autoklavert plantejord ble veid opp i 50 ml falkonrør. Totalt ble det veid opp 15 falkonrør per mating for henholdsvis autoklavert og

ikke-autoklavert jord for uttak på fem tidspunkt (24 t, 48 t, 72 t, 1 uke og 2 uker) etter inkubasjon på tre forskjellige temperaturer (15, 20 og  $37\pm 1$  °C). Deretter ble 100 µL av henholdsvis donor og resipient og 800 µL sterilt RO-vann tilsatt hvert falkonnrør på omtrent samme sted. Første uttak ble gjort etter 24 t. Jorden ble overført til stomacherposer, hvor det ble tilsatt 90 mL BPV-ISO og innholdet ble ristet godt. Videre ble 100 µL fra stomacherposen sådd ut på MC-cefo+nal agarskål og inkubert på  $37\pm 1$  °C over natt.

Dersom det ikke var vekst av transkonjuganter etter 24 t, ble det gjort et nytt uttak etter 48 t. Dersom det fortsatt ikke var vekst ble det gjort uttak etter 72 t, og videre etter 1 uke og 2 uker.

## 2.5 Persistens av cefalosporin-resistente *E. coli* i vann og jord

Forsøkene gikk over en periode på 10 uker med hensikt å undersøke persistens av cefalosporin-resistente *E. coli* i autoklavert og ikke-autoklavert vann og jord. Donorstammene (D1292 og D2798) fra konjugasjonsforsøket ble også benyttet i persistensforsøkene. Forsøkene ble utført ved  $15\pm 1$  °C for å simulere norsk sommertemperatur. Overnatt-kulturen som skulle tilsettes i de ulike matriksene ble kvantifisert med fortynningsrekker for å bestemme det opprinnelige antallet bakterier tilsatt til hver enkelt prøve. Ved hvert uttak ble det satt opp 10-folds fortynningsrekker, og det ble sådd ut på MC-cefo agarskåler fra passende fortyninger (som ikke ga overvekst eller manglende vekst på agarskålene). Det ble tatt med negative kontroller, ikke-inokulerte prøver av autoklavert og ikke-autoklavert jord og vann, som ble analysert tre ganger i løpet av lagringsperioden (start, midt og slutt). De negative kontrollene ble undersøkt ved at 1 mL av prøven eller fra første fortykning ble fordelt på tre MC-cefo for å senke deteksjonsgrensen til 10 kolonidannende enheter per gram (kde/g) for jord og én kde per mL (kde/mL) for vann.

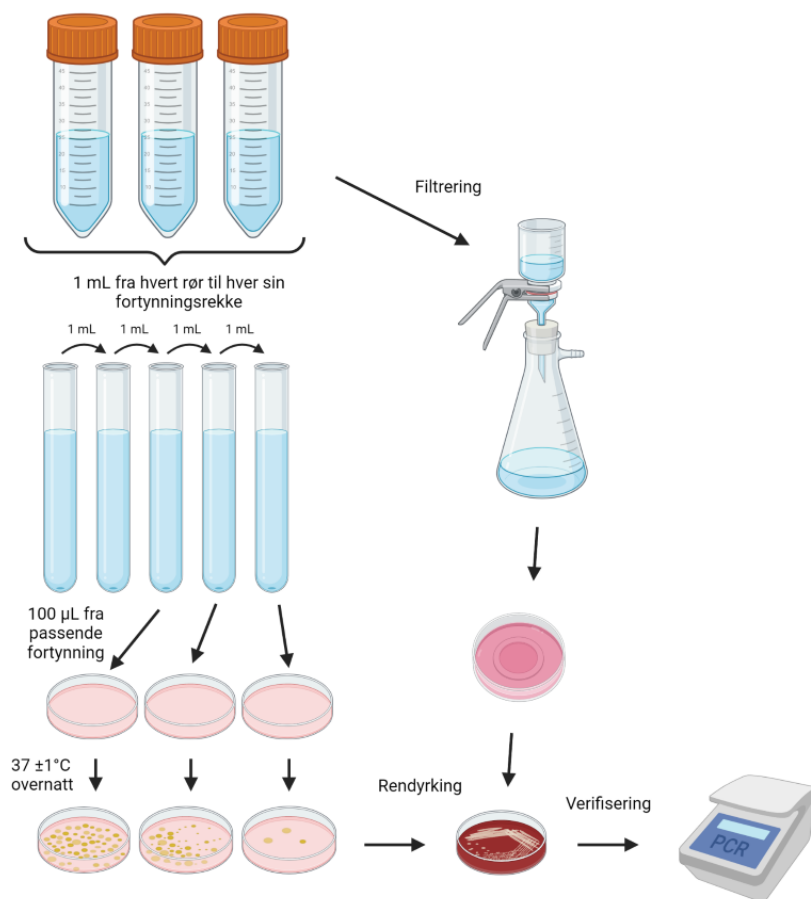


Figur 10 Eksempelbildet viser ett av uttakene fra persistensforsøk av D1292 i autoklavert jord.

### 2.5.1 Persistens av cefalosporin-resistente *E. coli* i autoklavert og ikke-autoklavert vann

Det ble målt opp 30 mL vann (autoklavert eller ikke-autoklavert) i 50 ml falkonrør. Hvert oppsett hadde fire sett med tre paralleller. Det var kun det ene settet som ble tatt i bruk ved hvert uttak, og de resterende var til eventuelle filtreringer senere i forsøket (se Figur 11). Det ble også tatt med negative kontroller, to falkonrør med autoklavert vann og to med ikke-autoklavert vann. Prøvene ble inokulert ved å tilsette 300  $\mu$ L overnatt-kultur til falkonrørene. Videre ble alle prøvene satt til inkubering på  $15 \pm 1$  °C. Uttakene ble gjennomført på dag 0, 1, 2, 3, 8, 9, 14, 16, 21, 23, 29, 36, 43, 50, 57 og 64, over en periode på til sammen 10 uker. Ved hvert prøveuttak ble det tatt ut 1 mL fra hver av de 12 falkonrørene, og det ble satt opp fortynningsrekker utfra forventet antall kde ved det aktuelle uttaket. Fra aktuelle fortyninger ble 100  $\mu$ L sådd ut på MC-cefo agarskål og spredd utover med L-stav. Skålene ble inkubert på  $37 \pm 1$  °C over natt og antall kolonier registrert neste dag.

Etter hvert uttak ble en tilfeldig typisk koloni fra hver kombinasjon rendyrket på blodskål og senere identifisert/verifisert med PCR og/eller MALDI-TOF.



Figur 11 Illustrerer uttakene til persistensforsøket i vann. Figuren viser ett sett med tre paralleller fra en av kombinasjonene hvor det ble overført 1 mL fra hvert falkonnrør til hver sin fortynningsrekke. 100 µL ble sådd ut på MC-cefo agarskåler fra passende fortynninger og inkubert ved  $37 \pm 1$  °C over natt. En tilfeldig typisk koloni fra hver kombinasjon ble videre rendyrket på blodskål og verifisert med PCR. Filtreringssteget på figuren skulle kun gjennomføres dersom antall kde var lavere enn synlig på den selektive agarskålen. Figuren er laget i bioRender.com av veileder Solveig Sølvørd Mo.

## 2.5.2 Persistens av cefalosporin-resistente *E. coli* i autoklavert og ikke-autoklavert jord

Det ble veid opp 10 g jord (autoklavert eller ikke-autoklavert) i 50 ml falkonnrør. Hvert oppsett hadde tre paralleller (se oversiktstabell over uttakene i Vedlegg 2). Prøvene ble inokulert ved å tilsette 100 µL overnatt-kultur av henholdsvis D1292 og D2798 til falkonnrør med hhv. autoklavert og ikke-autoklavert jord, til sammen fire kombinasjoner. I tillegg ble det tilsatt 900 µL sterilt RO-vann for å øke fuktigheten i prøvene. I de negative kontrollene ble det kun tilsatt 1 mL sterilt RO-vann. Dette var ikke-inokulerte falkonnrør med autoklavert jord og ikke-autoklavert jord og det ble satt opp tre falkonnrør av hver, i tillegg til noen reserve-rør. Inokulerte

prøver og negative kontroller ble satt til inkubering på  $15 \pm 1^\circ\text{C}$ . Uttakene ble gjennomført på dag 0, 1, 2, 3, 6, 8, 10, 14, 16, 21, 23, 29, 36, 43, 50, 57 og 64, over en periode på til sammen 10 uker. Ved hvert prøveuttak ble det tatt ut tre paralleller fra hver kombinasjon, til sammen 12 falkonrør. Materialet i falkonrørene ble overført til stomacherposer. Det ble tilsatt 90 mL BPV-ISO og blandet godt. Videre ble det satt opp fortynningsrekker utfra forventet antall kde, fra hver prøve. De negative kontrollene ble undersøkt som beskrevet under kapittel 2.5, men i tillegg ble én 10  $\mu\text{L}$  podeøse fra de oppformerte stomacherposene sådd ut på MC-cefo agarskål.

Det ble sådd ut fra fortynningsrekkene, inkubert, registrert og verifisert kolonier som beskrevet under kapittel 2.5.1.

## 2.6 Verifisering

### 2.6.1 MALDI-TOF

MALDI-TOF Biotyper (Bruker), ble benyttet til å identifisere ulike kolonier fra screeningene utført på vannet fra Årungen og plantejorden. Instrumentet identifiserer bakterier gjennom massespektrometri. Koloniene som skulle identifiseres ble overført til hver sin spot på en stålplate med bruk av en steril tannpirker eller podeøse. Det ble tilsatt 1  $\mu\text{L}$  70 % maursyre på hver spot med prøvemateriale som måtte tørke. Videre ble det tilsatt 1  $\mu\text{L}$  matriks (Bruker) som igjen måtte tørke før stålplaten ble analysert av MALDI-TOF instrumentet (Prosedyre, VI). Inne i instrumentet blir bakterienes proteiner fragmentert og ionisert ved hjelp av en laser. Disse ioniserte fragmentene blir videre separert i et vakuum utfra størrelse og ladning. Spekteret av proteinmønsteret til den gitte bakterien blir sammenlignet med spekteret fra andre kjente mikroorganismer som ligger i en database, og resultatet vises som en «score» om hvorvidt bakteriens proteinmønster ligner/matcher et annet kjent proteinmønster i databasen. (Croxatto et al., 2012)

### 2.6.2 Multiplex PCR for påvisning av *E. coli* fylotype

For å være sikker på at de presumptive transkonjugantene fra konjugasjonsforsøkene hadde riktig fylotype, altså den samme som resipientstammen, ble det benyttet multiplex PCR (prosedyre VI). Tilsvarende ble samme metode brukt for å undersøke utvalgte kolonier fra persistensforsøkene, som skulle ha samme fylotype som D1292 eller D2798. *E. coli* kan deles inn i fire fylogenetiske grupper; A, B1, B2 eller D. Bestemmelsen av hvilken gruppe et *E. coli*

isolat tilhører, baserer seg på tilstedeværelse eller fravær av fylogenetiske markører som inkluderer genene; *chuA*, *yjaA*, *gadA* og DNA-sekvensen TSPE4.C2 (Doumith et al., 2012).

Tabell 2 Den fylogenetiske gruppen til en *E. coli* stamme bestemmes ved å benytte amplifiseringsresultatene fra PCR av genene *gadA*, *chuA*, *yjaA* og DNA-sekvensen TSPE.C2 til tolkning av resultatene.

Fylogenetisk gruppe	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE4.C2
A	+	-	-/+	-
B1	+	-	-	+
B2	+	+	+	-/+
D	+	+	-	-/+

Tabell 3 Oversikt over primersekvenser brukt til fylogenetisk gruppering av *E. coli* ved multiplex PCR (Doumith et al., 2012).

Primer	Sekvens (5' -3')	Forventet størrelse bp
<i>gadA</i> forward	GATGAAATGGCGTTGGCGCAAG	373 bp
<i>gadA</i> reverse	GGCGGAAGTCCCAGACGATATCC	
<i>chuA</i> forward	ATGATCATCGCGGCGTGCTG	281 bp
<i>chuA</i> reverse	AAACGCGCTCGCGCCTAAT	
<i>yjaA</i> forward	TGTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT	216 bp
<i>yjaA</i> reverse	ACCTGTGACAAACCGCCCTCA	
TSPE4.C2 forward	GCGGGTGAGACAGAAACGCG	152 bp
TSPE4.C2 reverse	TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG	

Templat til PCR reaksjonene ble skaffet ved å ta en podeøse kolonimateriale fra blodskålene med renkulturer av *E. coli* som ble slemmet opp i 100 µL milliQ vann (Medieproduksjon, VI) i eppendorfrør. Eppendorfrørene ble satt i varmeblokk (Thermomixer komfort, Eppendorf) for å lysere cellene ved 100 °C i 15 minutter. Suspensjonen ble sentrifugert (Fresco 21, Heraeus, Thermo Scientific) ved 14 000 rpm i 5 minutter. Supernatanten med DNA ble overført til et nytt eppendorfrør og fryst ved -80 °C inntil PCR skulle settes opp. Til PCR ble det benyttet en positiv og en negativ kontroll i tillegg til prøvene. Den positive kontrollen var en *E. coli* stamme (*E. coli* 2003500827) kalt Bæ14 med fylotype B2, som var positiv for alle de tre genene *chuA*, *yjaA* og *gadA* og DNA-sekvensen TSPE4.C2 (Mo et al., 2016). Som negativ kontroll ble prøve med kun mastermix benyttet.

Primermixen ble laget ved å blande 10 µL av hver av primerne (Invitrogen); *gadA.F*, *gadA.R*, *chuA.F*, *chuA.R*, *yjaA.F*, *yjaA.R*, TSPE.C4.F og TSPE.C4.R (se tabell 3 for oversikt over primere) fra 100 µM løsningen og deretter tilsette 20 µL milliQ vann.

Mastermixen ble laget ved å blande 12,5µL av 2x Qiagen Multiplex PCR mix (Qiagen GmbH, Hilden, Tyskland) med 0,5 µL av 10 µM primermix og 10 µL milliQ vann per prøve. Det ble tilsatt 23 µL mastermix og 2 µL DNA templat til hver brønn i PCR strips (PCR® strip tubes, 0,2 mL thin wall, clear 8 strip tubes, Axygen). Stripsen ble sentrifugerte i noen sekunder for å spinne ned prøvematerialet og videre plassert i PCR instrumentet (Veriti, Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Programmet bestod av 6 ulike trinn, hvorav trinn 2-4 ble repetert i 30 syklener, se Tabell 4 under.

Tabell 4 Viser PCR programmet med en oversikt over temperaturen og varigheten til de ulike trinnene. Trinn 2-4 ble repetert i 30 syklener.

Trinn	Temperatur	Tid
1 (Enzymaktivering)	95 °C	15 minutter
2 (Denaturering)	95 °C	30 sekunder
3 (Annealing)	60 °C	30 sekunder
4 (Elongering)	72 °C	30 sekunder
5	72 °C	5 minutter
6	8 °C	Uendelig

Agilent 4200 TapeStation (Germany) ble brukt for å visualisere PCR produktene og dermed identifisere fylotypen til *E. coli* isolatene.

### 2.6.3 Real-time PCR for deteksjon av *bla<sub>CMY-2</sub>*

Det ble satt opp real-time PCR for å påvise *bla<sub>CMY-2</sub>* genet (prosedyre VI) og dermed verifisere overføring av plasmid. DNA ble ekstrahert som beskrevet under multiplex PCR. Det ble benyttet en PCR-plate (PCR-Platte Vollrand LP transp, SARSTEDT) hvor det ble tilsatt 18 µL mastermix og 2 µL DNA per brønn. Mastermixen som skulle benyttes til hver enkelt reaksjon bestod av 7 µL milliQ vann, 10 µL 2x Brilliant III UF Master Mix (Agilent Technologies) og 1 µL 20X qPCR-assay (Integrated DNA Technologies) bestående av tidligere publisert primer og probe (Schmidt et al., 2015). For å senke konsentrasjonen og dermed risiko for

kontaminering ble prøvene fra siste kjøring med real-time PCR fortynnet 100x, ved å tilsette 5 µL prøvemateriale til 495 µL nukleasefritt vann (50 mL, Qiagen).

I Tabell 5 under vises primer- og probesekvensene. I hvert oppsett ble det tatt med positiv kontroll og negativ kontroll. Positiv kontroll bestod av *bla<sub>CMY-2</sub>* positiv *E. coli* (D1292 eller D2798), og negativ kontroll bestod av kun mastermix.

Tabell 5 Oversikt over primere og probe benyttet til real-time PCR for påvisning av *bla<sub>CMY-2</sub>* genet (Schmidt et al., 2015).

Primere og probe	Sekvens (5' -3')
<i>FW3_CMY-2_Lahey</i>	AGACGTTTAACGGCGTGTTG
<i>RV4_CMY-2_Lahey</i>	TAAGTGCAGCAGGCGGATAC
<i>PR_CMY-2_Lahey</i>	TATCGCCCGCGGCGAAAT

Platen ble spunnet i en sentrifuge (PCR plate spinner, VWR) i noen sekunder for å spinne ned innhold og fjerne luftbobler. Instrumentet som ble benyttet til real-time PCR var Agilent AriaMx (Agilent Technologies). PCR-programmet vises i Tabell 6 under og består av tre trinn. Trinn 2 og 3 ble repetert i 45 syklar.

Tabell 6 Real-time PCR program brukt ved påvisning av *bla<sub>CMY-2</sub>* genet.

Trinn	Temperatur	Tid	Sykler
1 (Enzymaktivering)	95 °C	3 minutter	En syklus
2 (Denaturering)	95 °C	10 sekunder	45 syklar
3 (Annealing og elongering)	60 °C	20 sekunder	

Resultatene ble analysert i programmet AriaMx Software, versjon 1.8(Agilent Technologies) og avlest her. I programmet ble hver enkelt prøve sett som en kurve med antall syklar på x-aksen og målt fluorescens på y-aksen. Threshold ( $\Delta R$ ) ble justert automatisk ved hver kjøring og Ct-verdier ble angitt utfra dette.

## 2.7 Databehandling og statistisk analyse

Rådataene fra persistensforsøkene ble organisert og analysert ved hjelp av dataprogrammet Microsoft Excel. Det ble laget plott som viser tidsserier for hvert forsøk. I disse plottene vises



antall dager fra oppstart av forsøkene langs x-aksen og antall kde langs y-aksen. Hvert datapunkt i tidsseriene er basert på tre paralleller (kolonitelling av 3 skåler). Aritmetisk middelværdi og standardavvik for disse tre parallellene ble beregnet med funksjonene GJENNOMSNIITT og STDAV.P (standardavviket når hele populasjonen er kjent). Variasjonen mellom paralleller er vist med usikkerhetsstolper i figurene, som angir gjennomsnitt  $\pm 1$  standardavvik.

For å teste om de ulike matriksene (autoklavert og ikke autoklavert vann og jord) hadde signifikant effekt på antall bakterier som persisterte, ble det gjennomført en statistisk test.

De mest brukte statistiske testene forutsetter at dataene er normalfordelte. Dersom denne forutsetningen ikke holder blir resultatet av testen feil. Før type test kunne bestemmes ble det derfor gjennomført en standard normalitetstest på alle tidsseriene. For hver tidsserie fra persistensforsøkene ble det laget et xy-plott for test av normalitet. Konklusjonen fra tolkning av disse plottene var at kun 2 av de 8 tidsseriene sannsynligvis inneholdt normalfordelte data. Flere av tidsseriene avvok sterkt fra en antakelse om normalfordeling (se Vedlegg 6).

Wilcoxon Sign Rank Test er en ikke-parametrisk test, som brukes til å sammenligne to sett av observasjoner med ukjent sannsynlighetsfordeling. Testen er designet for å vurdere om det er en signifikant forskjell mellom gjennomsnittene av to sett av observasjoner (Sokal & Rohlf, 2000).

Wilcoxon Sign Rank Test er basert på en rangordning av differansen mellom observasjonene i de to utvalgene (rangering i stigende rekkefølge for observasjonene). Testen beregner deretter en teststatistikk basert på de rangerte forskjellene mellom parene av observasjoner og gir en p-verdi som indikerer sannsynligheten for å observere en forskjell så stor som eller større enn den som er observert, hvis nullhypotesen om ingen forskjell er sann (Sokal & Rohlf, 2000).

Testen ble gjennomført i Excel ved at det for hvert tidspunkt ble regnet ut en differanse:

$$(1) D = \text{autoklavert verdi} - \text{ikke autoklavert verdi}$$

Deretter ble det funnet absoluttverdien av alle D verdier som ikke var 0:

$$(2) \text{Abs } D = \text{HVIS } (D = 0; "", \text{ABS}(D))$$

Rang for hver av Abs D verdiene i celleområdet I6 til I21 ble funnet med formelen:

$$(3) \text{ Rang Abs D} = \text{HVIS}(I6 = ""; ""; \text{RANG.GJSN}(I6; \$I\$6: \$I\$21; 1))$$

Funksjonen gir alle Abs D verdiene en rangeringsverdi fra minste til største (1 til N).

Deretter ble Rang verdiene sortert i to grupper (for henholdsvis de positive og negative D verdiene):

$$(4) \text{ Positiv rang} = \text{HVIS}(E6 > 0; G6; "")$$

$$(5) \text{ Negativ rang} = \text{HVIS}(E6 < 0; G6; "")$$

Deretter ble summen som var lavest av positive eller negative Rang funnet:

$$(6) \text{ Laveste sum Rang} = \text{MIN}(\text{SUMMER}(H6: H21); \text{SUMMER}(I6: I21))$$

Denne summen er test statistikken i denne metoden. Test-statistikken ble sammenlignet med tabulerte kritiske verdier med antall observasjoner N og feilsannsynlighet  $\alpha = 0,005$  (Vedlegg 11).

Et eksempel på en av de gjennomførte hypotesetestene er:

H0: Gruppene autoklavert og ikke-autoklavert D1292 i matriksen vann er like

H1: Gruppene autoklavert og ikke-autoklavert D1292 i matriksen vann er ulike

Dersom test statistikken var lavere enn kritisk verdi kunne H0 forkastes og det var signifikant forskjell på de to matriksene. Tabellen under gir en oversikt over de fire parvise hypotesetestene som ble gjennomført. Eksempelet over er markert med uthevet rute i Tabell 7.

Tabell 7. Oversikt over hypotesetestene for de fire persistensforsøkene.

<i>E. coli</i>	D1292		D2798		D1292		D2798	
	Vann				Jord			
Matriks	Autoklavert	Ikke-autoklavert	Autoklavert	Ikke-autoklavert	Autoklavert	Ikke-autoklavert	Autoklavert	Ikke-autoklavert

## 3 RESULTATER

### 3.1 Screening

Vannet fra Årungen og plantejorden fra Maxbo som skulle benyttes i konjugasjons- og persistensforsøkene ble på forhånd screenet for å utelukke naturlig tilstedeværelse av cefalosporin- og/eller kinolon-resistente *E. coli*. Både autoklavert og ikke-autoklavert matriks ble screenet.

#### 3.1.1 Screening av vann fra Årungen, autoklavert og ikke-autoklavert

Det var vekst av ulike kolonier på noen av screeningskålene med filter fra det ikke-autoklaverte vannet fra Årungen. På MC-cefo og MC-cefo+nal, var det vekst av små fargeløse kolonier som ble konkludert til ikke å være *E. coli* utfra den utypiske morfologien på den selektive agarskålen og det negative utslaget på indol. På MC med nalidiksinsyre-lapp, var det vekst av typiske rosa kolonier. Disse var negative på indol-test. De rosa koloniene ble i tillegg undersøkt med MALDI-TOF og ble identifisert som *Aeromonas* sp, en bakterie som naturlig finnes i ferskvann.

Det ble ikke påvist *E. coli* med naturlig tilstedeværelse av cefalosporin- og/eller kinolon-resistens i det ikke-autoklaverte vannet. Det var ingen vekst på noen av screeningskålene fra det autoklaverte vannet.

#### 3.1.2 Screening av plantejord, autoklavert og ikke-autoklavert

Det var overvekst av uidentifiserte jordbakterier på de tre fortyningene som ble sådd ut på MC-cefo, men det var ingen vekst av synlige rosa kolonier med typisk *E. coli* morfologi. Det samme ble observert etter oppformering av den ikke-autoklaverte jorden. Det ble også benyttet MC med nalidiksinsyre-lapp for å avdekke naturlig forekommende kinolon-resistente *E. coli*. Det var også her overvekst av uidentifiserte jordbakterier på screeningskålene, men en klar sone rundt hver lapp på tre parallelle agarskåler. Det var ingen vekst av typiske rosa kolonier.

Det ble dermed ikke påvist *E. coli* med cefalosporin- og/eller kinolon-resistens i den ikke-autoklaverte jorden. Det var ingen vekst på noen av screeningskålene fra den autoklaverte jorden.

## 3.2 Konjugasjonsforsøk

Konjugasjon av AMR-plasmider mellom ulike *E. coli* stammer ble undersøkt ved å tilsette donorstamme og resipientsamme i ulike matrikser og inkubere matingene ved tre ulike temperaturer (15, 20 og 37 ±1 °C).

### 3.2.1 Verifisering av presumptive transkonjuganter fra konjugasjonsforsøkene

Forsøksoppsettene og resultatene fra alle verifiseringene er vist i Vedlegg 3. Alle forsøksoppsettene har en unik prøve-ID som er henvist til i resultatgjennomgangen. Forventede transkonjuganter skulle ha fylotype B1, som resipienten, og inneholde resistensgenet *bla<sub>CMY-2</sub>*. Alle presumptive transkonjuganter som ble verifisert med disse egenskapene er ikke omtalt videre, men det henvises til Vedlegg 3. Presumptive transkonjuganter som ikke ble verifisert er omtalt i respektive avsnitt under.

### 3.2.2 Konjugasjonsforsøk i buljong

I LB-buljong ble det påvist konjugasjon allerede etter 4 timer ved 37 °C for begge matingene. For mating D1292+R skjedde konjugasjon etter 48 timer ved 15 °C og etter 72 timer ved 20 °C. For D2798+R ble det påvist konjugasjon etter 24 timer ved temperaturen 20 °C, mens ved 15 °C skjedde det først etter 72 timer (Tabell 8).

Tabell 8 Konjugasjon i buljong fra matingen av henholdsvis D1292 og D2798 med resipienten. Vekst av verifisert transkonjugant på agarskål eller ingen vekst er angitt som + eller -. IU= ikke uttak.

LB-buljong					
Mating	Temperatur	4 t	24 t	48 t	72 t
D1292+R	15 °C	IU	-	+	IU
	20 °C	IU	-	-	+
	37 °C	+	IU	IU	IU
D2798+R	15 °C	IU	-	-	+
	20 °C	IU	+	-	IU
	37 °C	+	IU	IU	IU

Det var én koloni, KB 5 (konjugasjon buljong, D1292+R, 20 °C, 48 timer), som viste fylotype D, den samme som D1292 og positivt resultat av *bla*<sub>CMY-2</sub>. Her var det mest sannsynlig vekst av den ene donorstammen D1292, ikke en transkonjugant.

### 3.2.3 Konjugasjonsforsøk i sterilt RO- vann

I sterilt RO-vann ble det ikke påvist konjugasjon for mating D1292+R. I de tilsvarende forsøkene for D2798+R, ble konjugasjon kun registrert ved 37 °C etter 24 timer. Det ble ikke registrert konjugasjon innen 72 timer for verken 15 eller 20 °C.

### 3.2.4 Konjugasjonsforsøk i vann fra Årungen

I autoklavert og ikke-autoklavert vann ble det påvist konjugasjon for begge matingkulturene ved 37 °C etter 24 timer. Ved 15 og 20 °C ble det ikke registrert konjugasjon etter 72 timer, derfor ble forsøksperioden for autoklavert og ikke-autoklavert vann utvidet til totalt to uker og vannet ble filtrert den siste uken for å senke deteksjonsgrensen (se Tabell 9 og Tabell 10).

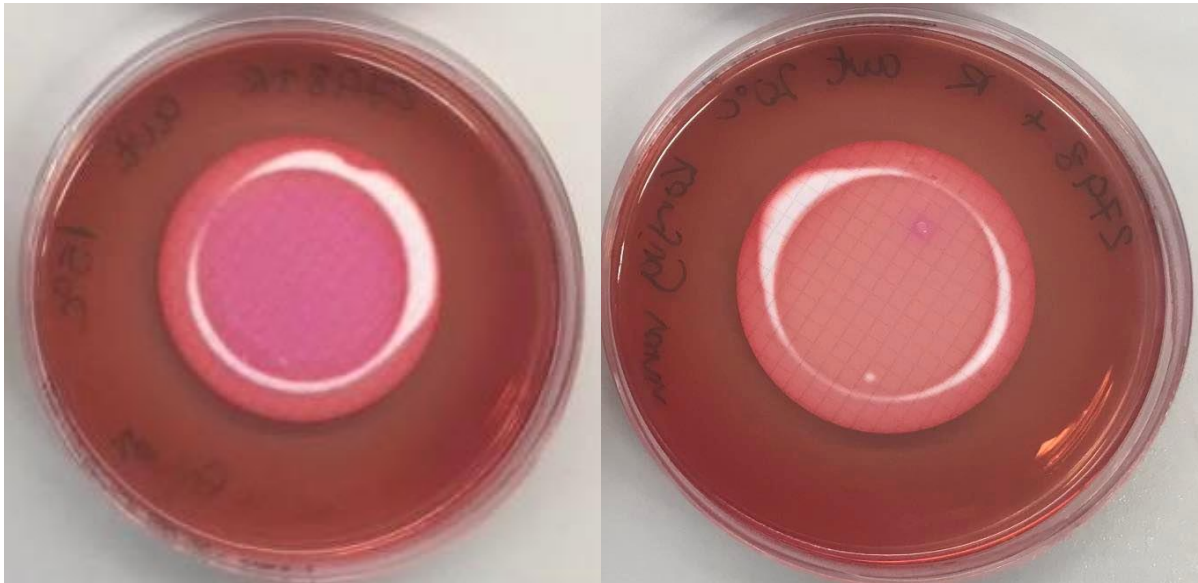
Tabell 9 Konjugasjon i autoklavert vann fra Årungen, fra matingen av henholdsvis D1292 og D2798 med resipienten. Vekst av verifisert transkonjugant på agarskål eller ingen vekst er angitt som + eller -. IU= ikke uttak.

Autoklavert vann						
Mating	Temperatur	24 t	48 t	72 t	1 uke	2 uker
D1292+R	15 °C	-	-	-	-	-
	20 °C	-	-	-	-	-
	37 °C	+	IU	IU	IU	IU
D2798+R	15 °C	-	-	-	-	-*
	20 °C	-	-	-	-	-*
	37 °C	+	IU	IU	IU	IU

\*Vekst av kolonier som ikke ble verifisert som transkonjuganter

Det var vekst av rosa kolonier på MC-cefo+nal fra autoklavert vann med matingen D2798+R inkubert på 15±1 °C og 20±1 °C som ble filtrert etter to uker (Figur 12). To utvalgte presumptive transkonjuganter, koloni KAV 5 og KAV 6, ble ikke verifisert siden fylotypen var A, men begge hadde positivt resultat av *bla*<sub>CMY-2</sub>. Det var dermed ingen konjugasjon som hadde

skjedd, bare donorstammen som hadde overlevd i vannet og som klarte å vokse på MC-cefo+nal.



Figur 12. MC-cefo+nal fra autoklavert vann med matingen av D2798+R inkubert på 15±1 °C (venstre) og 20±1 °C (høyre) som ble filtrert etter to uker. Kolonien KAV 5 ble hentet fra agarskålen på venstre bilde og kolonien KAV 6 ble hentet fra agarskålen på høyre bilde.

Det var også for ikke-autoklavert vann, vekst av rosa kolonier på MC-cefo+nal med matingen D2798+R inkubert på 15±1 °C som ble filtrert etter to uker. Én rosa koloni, KV 7, ble undersøkt med PCR for identifisering av mulig transkonjugant. Resultatet fra PCR viste samme fylotype og resistensgen som D2798. Det var ingen konjugasjon som hadde skjedd, bare donorstammen som hadde overlevd i vannet og som klarte å vokse på MC-cefo+nal.

Tabell 10 Konjugasjon i ikke-autoklavert vann fra Årungen, fra matingen av henholdsvis D1292 og D2798 med resipienten. Vekst av verifisert transkonjugant på agarskål eller ingen vekst er angitt som + eller -. IU= ikke uttak.

Ikke-autoklavert vann						
Mating	Temperatur	24 t	48 t	72 t	1 uke	2 uker
D1292+R	15 °C	-	-	-	-	-
	20 °C	-	-	-	-	-
	37 °C	+	IU	IU	IU	IU
D2798+R	15 °C	-	-	-	-	-*
	20 °C	-	-	-	-	-
	37 °C	+	IU	IU	IU	IU

\*Vekst av kolonier som ikke ble verifisert som transkonjuganter

### 3.2.5 Konjugasjonsforsøk i plantejord

I autoklavert plantejord ble det påvist konjugasjon for begge matingkulturene ved 37 °C. For D2798+R skjedde konjugasjonen etter 24 timer, mens for D1292+R ble konjugasjon først registrert etter 72 timer (Tabell 11). Ved 15 og 20 °C ble det ikke registrert konjugasjon. Siden det ikke ble registrert noen konjugasjon etter 72 timer ved disse temperatuene, ble forsøksperioden for autoklavert og ikke-autoklavert plantejord utvidet til totalt to uker.

Tabell 11 Konjugasjon i autoklavert plantejord, fra matingen av henholdsvis D1292 og D2798 med resipienten. Vekst av verifisert transkonjugant på agarskål eller ingen vekst er angitt som + eller -. IU= ikke uttak.

Autoklavert plantejord						
Mating	Temperatur	24 t	48 t	72 t	1 uke	2 uker
D1292+R	15 °C	-	-	-	-	-
	20 °C	-	-	-	-	-
	37 °C	-	-	+	IU	IU
D2798+R	15 °C	-	-	-	-	-
	20 °C	-	-	-	-	-
	37 °C	+	+*	+	IU	IU

\*Vekst av både reelle transkonjuganter (verifisert) og kolonier som ikke ble verifisert

I autoklavert plantejord ble kolonien KAJ 3 (konjugasjon autoklavert jord, D2798+R, 37 °C, 48 timer) ikke verifisert. Dette var en utypisk koloni, og den fikk ingen synlige bånd ved fylotyping. I tillegg ble det et negativt resultat av *bla<sub>CMY-2</sub>*.

For den ikke-autoklaverte plantejorden ble én lyserosa koloni, KJ 6 (konjugasjon ikke-autoklavert jord, D1292+R, 20 °C, 72 timer), rendyrket og videre undersøkt med real-time PCR og MALDI-TOF. PCR bekreftet at isolatet ikke var en transkonjugant utfra fravær av resistensgenet *bla<sub>CMY-2</sub>*. Kolonien ble identifisert som *Pseudomonas sp* med MALDI-TOF, og var mest sannsynlig en bakterie som fantes naturlig i plantejorden. Det ble ikke registrert konjugasjon for noen av matingkulturene i den ikke-autoklaverte jorden.

### 3.3 Persistens av cefalosporin-resistente *E. coli* i vann og jord

Hensikten var å undersøke overlevelsen av cefalosporin-resistente *E. coli* i disse matriksene ved 15 °C. Overnatt-kulturene av inokulat-stammene D1292 og D2798 ble tilsatt i de ulike matriksene og kvantifisert for å bestemme det opprinnelige antallet bakterier tilsatt til hver enkelt prøve. I persistensforsøket i autoklavert og ikke-autoklavert vann ble samme mengde inokulat på 300 µL tilsatt alle vannprøvene. Inokulatet for D1292 inneholdt ca.  $1,9 \times 10^8$  kde og inokulatet for D2798 inneholdt ca.  $2,0 \times 10^8$  kde. I persistensforsøket i autoklavert og ikke-autoklavert jord ble samme mengde inokulat på 100 µL tilsatt alle jordprøvene. Inokulatet for D1292 inneholdt ca.  $8,3 \times 10^7$  kde og inokulatet for D2798 inneholdt ca.  $5,2 \times 10^7$  kde. Forsøkene gikk over en periode på 10 uker.

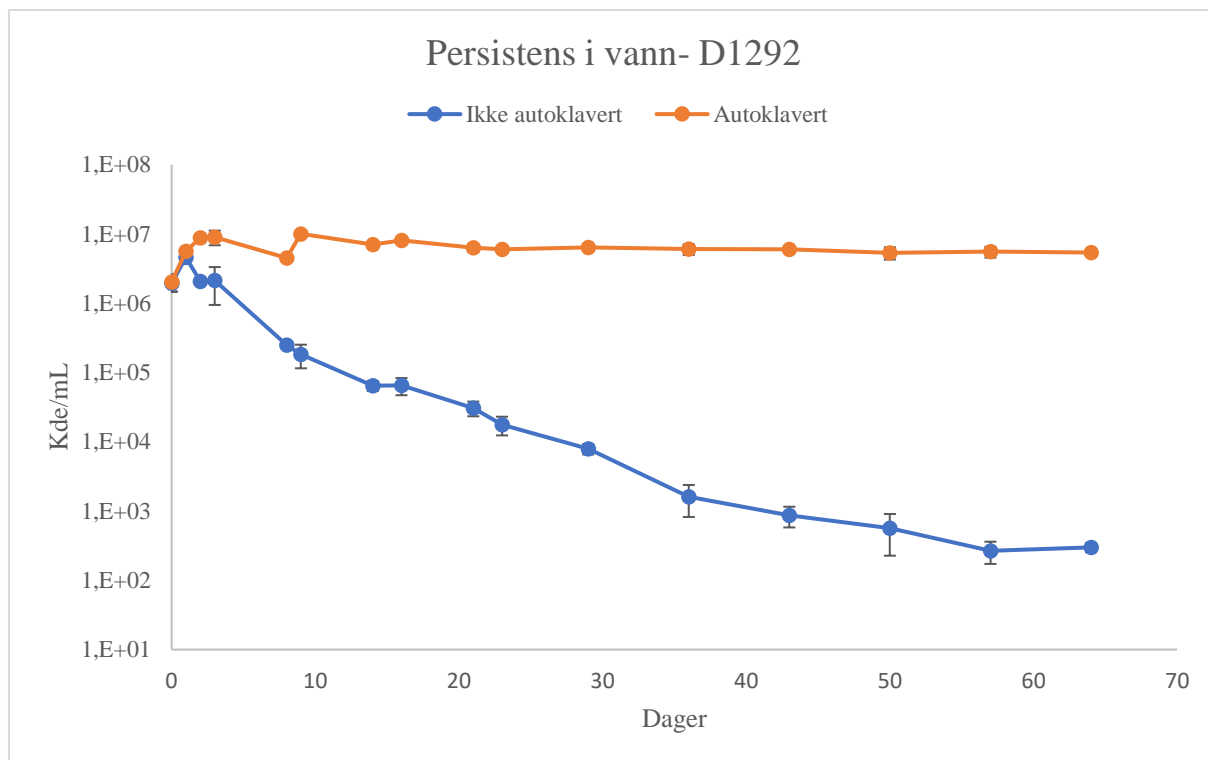
#### 3.3.1 Persistens av cefalosporin-resistente *E. coli* i autoklavert og ikke-autoklavert vann

For begge persistensforsøk i vannmatriks ga Wilcoxon Signed Rank Test signifikant forskjell ( $p < 0.005$ ) mellom gruppene autoklavert og ikke-autoklavert (Figur 13 og Figur 14).

I det autoklaverte vannet for D1292 ble det observert vekst fra dag 0 med ca.  $2,0 \times 10^6$  kde/mL til dag 1 med  $5,6 \times 10^6$  kde/mL. Etter dag 1 var veksten avtagende frem til dag 3. Ved dag 8 var antallet redusert til ca.  $4,5 \times 10^6$  kde/mL. Videre fikk vi en ny periode med vekst fram til målingen ved dag 9, da antallet lå på ca.  $10^7$  kde/mL. Fra dette tidspunktet og helt frem til forsøkets siste dag (dag 64) var antallet nokså stabilt, men svakt nedadgående og i underkant av  $10^7$  kde/mL. Siste registrerte antall (på dag 64) var på ca.  $5,3 \times 10^6$  kde/mL (Figur 13).

I det ikke-autoklaverte vannet for D1292 ble det også observert vekst det første døgnet. I denne perioden økte antallet fra ca.  $1,9 \times 10^6$  til ca.  $4,6 \times 10^6$  kde/mL. Antallet ble deretter redusert til dag 2, for så å øke marginalt til dag 3. Fra og med dag 3 ble det observert reduksjon, men endringstakten avtok gradvis helt frem til dag 64. Da var antallet på ca.  $3,0 \times 10^2$  kde/mL (Figur 13).





Figur 13 Persistens hos *E. coli* D1292 med antall kde per mL (y-aksen har logaritmisk skala, men med y-verdier på standardform) over en tidsperiode på 10 uker (x-aksen) i autoklavert vann (oransje) og ikke-autoklavert vann (blå). Usikkerhetsstolpene viser  $\pm$  ett standardavvik basert på tre paralleller (N=3). Se tallverdier i Vedlegg 7.

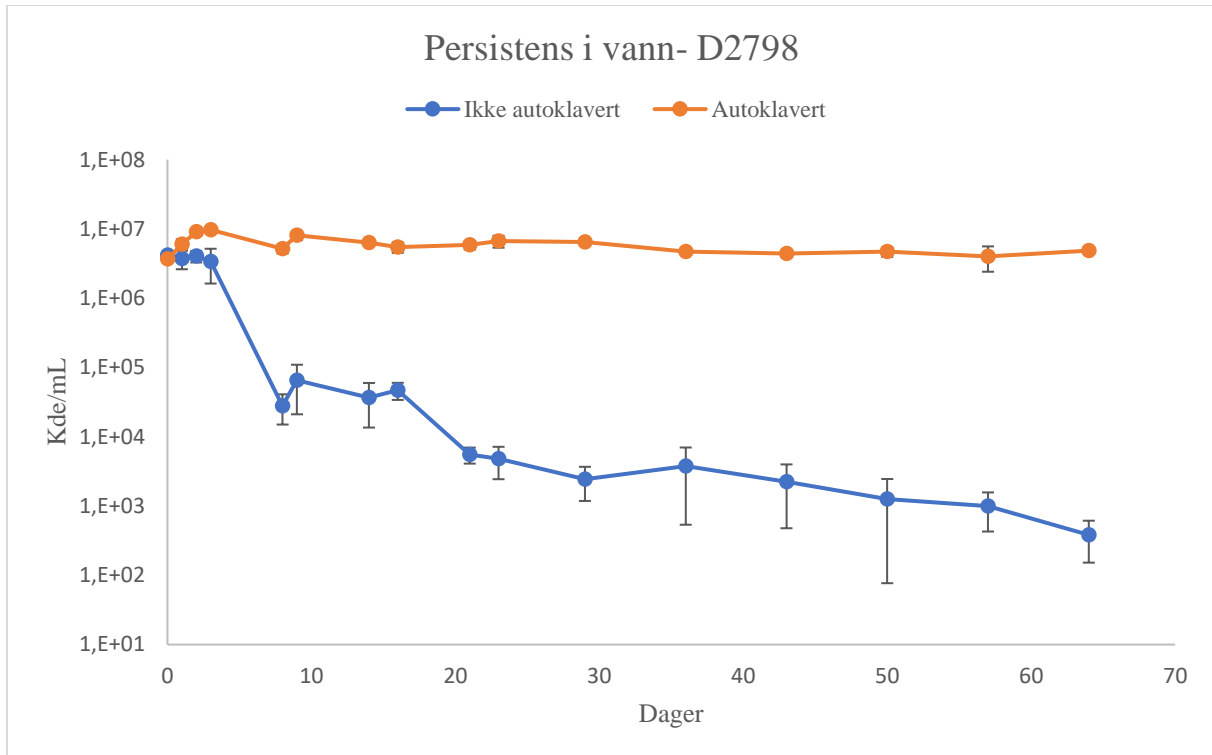
Standardavviket for D1292 i persistensforsøket i vann, tyder på relativt lav og ikke noen systematisk forskjell i usikkerheten mellom autoklavert og ikke-autoklavert vann. Det er heller ikke noe som tyder på at usikkerheten har endret seg gjennom forsøksperioden (Vedlegg 7). Presentasjonen av usikkerhet er noe misvisende i figuren over på grunn av den logaritmiske skalaen der usikkerhetsstolpene blir komprimert ved høye kde verdier. Dette gjelder for Figur 13 til og med Figur 16. Det henvises til Vedlegg 7-10 for alle tallverdiene bak figurene.

I det autoklaverte vannet med D2798 var det vekst frem til dag 1 med en økning fra  $3,6 \times 10^6$  kde/mL til  $6,0 \times 10^6$  kde/mL. Deretter var det en utflating frem til dag 3 da antallet nådde ca.  $9,7 \times 10^6$  kde/mL. Antallet sank deretter frem til dag 8, før det steg bratt opp igjen til dag 9. Deretter viste alle uttak en svak nedadgående trend frem til dag 64 da antallet var på ca.  $4,8 \times 10^6$  kde/mL (Figur 14).

I det ikke-autoklaverte vannet for D2798, ble det ikke observert noen initialfase med vekst. Fra dag 0 til og med dag 3 var det en svært moderat nedgang i antallet (fra ca.  $4,1 \times 10^6$  til ca.  $3,4 \times 10^6$  kde/mL). Deretter falt antallet svært raskt frem til dag 8, da det kun ble registrert ca.  $2,8 \times 10^4$  kde/mL).

kde/mL. Videre var det en tilnærmet like bratt vekst frem til dag 9. Fra dag 9 og ut resten av forsøket var trenden svakt nedadgående med noe variasjon, spesielt i perioden mellom dag 9 og dag 36. Ved dag 64 hadde antallet sunket til ca.  $3,8 \times 10^2$  kde/mL (Figur 14).

Det kunne se ut som *E. coli* stammene D1292 og D2798 hadde nokså lik utvikling gjennom persistensforsøkene i vann, men D2798 så likevel ut til å ha en raskere reduksjon enn D1292. For begge stammene var antallet bakterier ved forsøkets slutt omtrent likt.



Figur 14 Persistens hos *E. coli* D2798 med antall kde per mL (y-aksen har logaritmisk skala, men med y-verdier på standardform) over en tidsperiode på 10 uker (x-aksen) i autoklavert vann (oransje) og ikke-autoklavert vann (blå). Usikkerhetsstolpene viser  $\pm$  ett standardavvik basert på tre paralleller (N=3). Se tallverdier i Vedlegg 8.

Forskjellene mellom de tre parallellene for D2798 i persistensforsøket i vann, ser ut til å være noe høyere enn i det tilsvarende forsøket med D1292 utfra usikkerhetsstolpene i Figur 13 og Figur 14. Dette ser særlig ut til å gjelde for de ikke-autoklaverte prøvene.

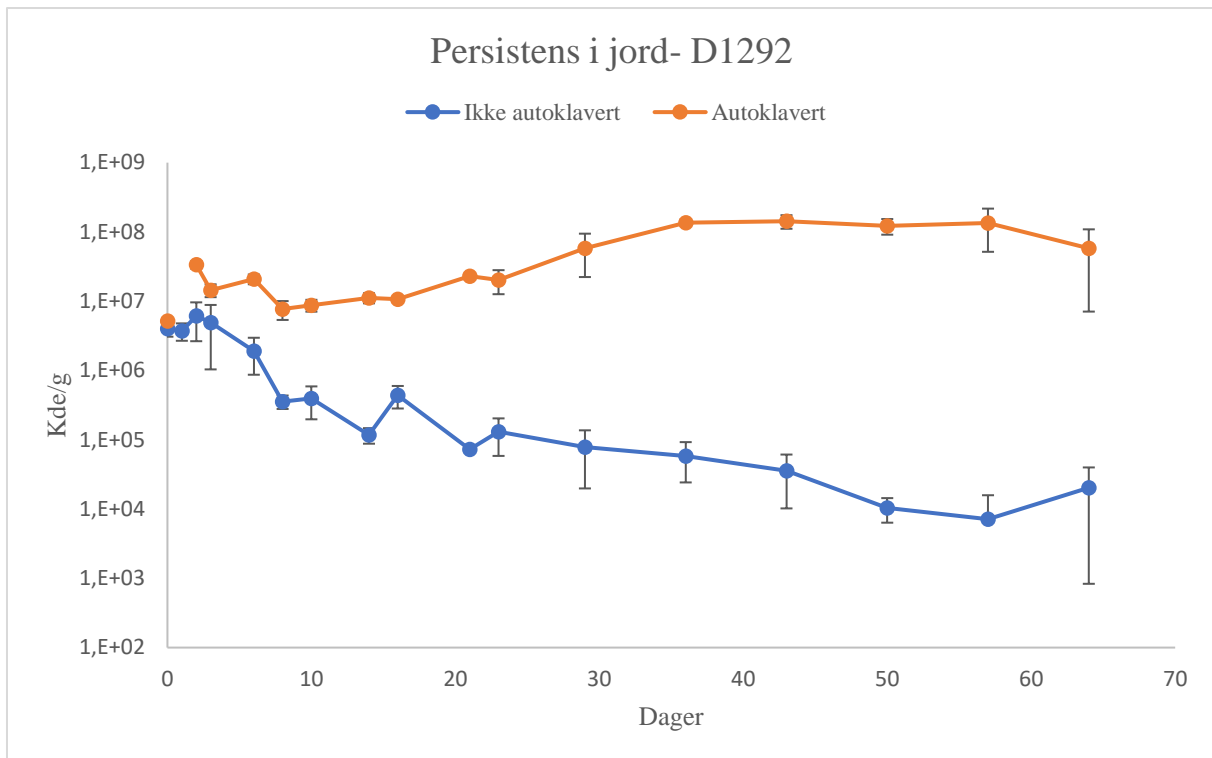
Det ble ikke observert vekst på MC-cefo agarskålene fra de negative kontrollene ved starten (dag 0), midten (dag 16) eller slutten (dag 64) av forsøksperioden. Dette gjaldt for både autoklavert og ikke-autoklavert vann.

### 3.3.2 Persistens av cefalosporin-resistente *E. coli* i autoklavert og ikke-autoklavert jord

For begge persistensforsøk i jordmatriks ga Wilcoxon Signed Rank Test signifikant forskjell ( $p < 0.005$ ) mellom gruppene autoklavert og ikke-autoklavert (Figur 15 og Figur 16).

I persistensforsøket med D1292 i autoklavert jord kontra ikke-autoklavert jord, så begge ut til å ha en initialfase på tilnærmet to dager med vekst. I autoklavert jord steg antallet fra  $5,2 \times 10^6$  kde/g ved dag 0 til en foreløpig topp ved dag 2 på  $3,4 \times 10^7$  kde/g, før det igjen sank til  $7,7 \times 10^6$  kde/g ved dag åtte. Videre steg antallet jevnt, frem til dag 36. Etter dette lå antallet stabilt på ca.  $10^8$  kde/g frem til dag 64 da antallet var på ca.  $5,8 \times 10^7$  kde/g. Sammenlignet med dag 0, økte antall kde/g med ca. en faktor ti. I autoklavert jord mangler det datapunkt ved dag én fordi det ble laget feil fortynningsrekke, slik at det ikke var mulig å telle antall kolonier her (Figur 15).

I den ikke-autoklaverte jorden for D1292 derimot, var det en tydelig negativ trend etter initialfasen med vekst fra dag 0 ( $5,2 \times 10^6$  kde/g) frem til dag 2 ( $6,1 \times 10^6$  kde/g). I perioden mellom dag 2 og dag 23 var antall kde/g nedadgående og relativt varierende. Etter dag 23 viste uttakene derimot en jevnere og mer stabil nedadgående utvikling. Et bunnpunkt ble nådd ved dag 57, da var antallet målt til ca.  $7,1 \times 10^3$  kde/g. Ved dag 64 ble det registrert en økning til ca.  $2,0 \times 10^4$  kde/g (Figur 15).



Figur 15 Persistens hos *E. coli* D1292 med antall kde per gram jord (y-aksen har logaritmisk skala, men med y-verdier på standardform) over en tidsperiode på 10 uker (x-aksen) i autoklavert jord (oransje) og ikke-autoklavert jord (blå). Usikkerhetsstolpene viser  $\pm$  ett standardavvik basert på tre paralleller (N=3). Ved dag 57 for ikke-autoklavert jord er standardavviket betydelig og - 1 standardavvik gir y-verdi  $<0$  og kan ikke vises på logaritmisk skala. Se tallverdier i Vedlegg 9.

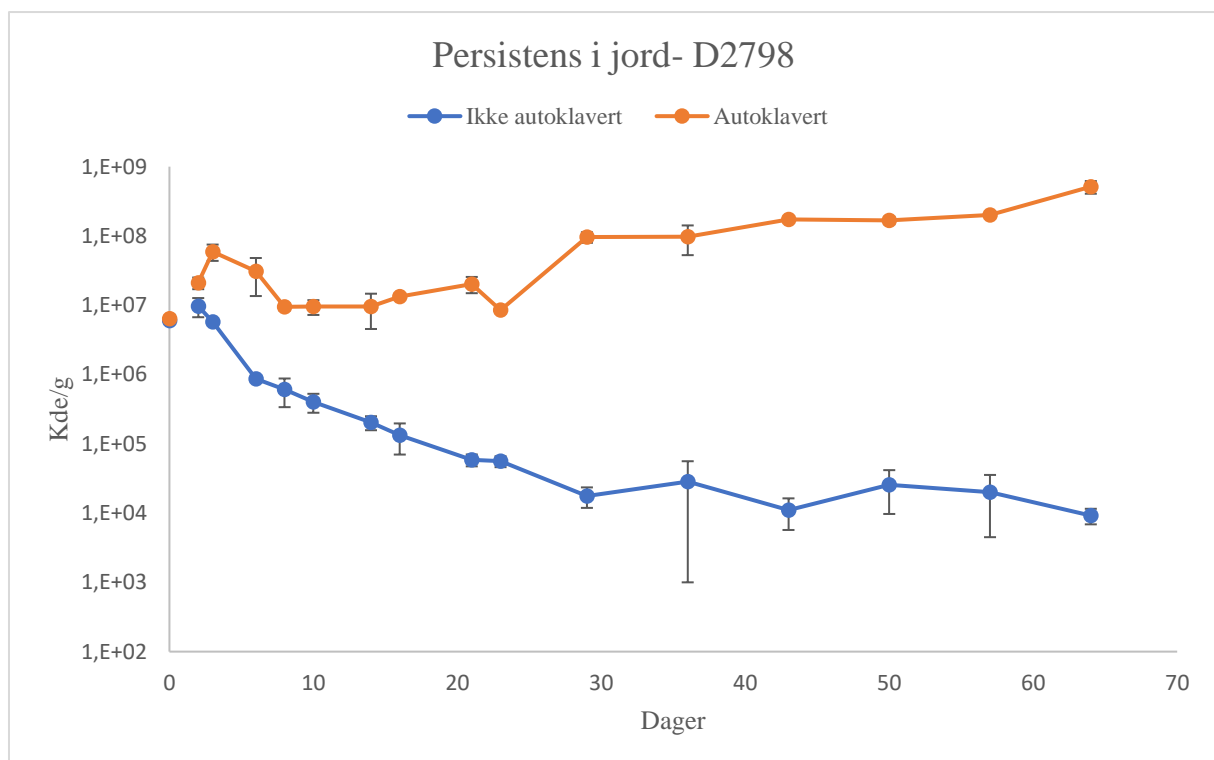
Forskjellene mellom de tre parallellene for D1292 i persistensforsøket i jord, er for flere av prøveuttakene relativt høye. For uttaket på dag 57 i ikke-autoklavert jord, viste de tre parallellene et antall på 4, 16 og 194 kde, noe som medførte et svært høyt standardavvik.

Det var også for D2798 signifikant forskjell i persistens i autoklavert jord kontra ikke-autoklavert jord. Begge hadde en initialfase med vekst, selv om denne fasen var tydeligere i autoklavert jord. I autoklavert jord var antallet på  $6,4 \times 10^6$  kde/g ved dag 0 og  $5,9 \times 10^7$  kde/g ved dag 3. I autoklavert jord sank antall kde/g deretter frem til dag 8 til 10. Gjennom resten av forsøksperioden ble det observert en stigende trend der antallet økte moderat, men jevnt og stabiliserte seg noe over  $10^8$  kde/g. Imidlertid ble trenden kortvarig brutt ved dag 23 da det ble målt ca.  $8,5 \times 10^6$  kde/g, dette var en reduksjon fra antallet på  $2,0 \times 10^7$  kde/g som ble målt ved dag 21. Ved forsøkets avslutning på dag 64 var antallet ca.  $5,1 \times 10^8$  kde/g (Figur 16).

I den ikke-autoklaverte jorden for D2798 derimot, var det en negativ trend etter initialfasen ( $6,0 \times 10^6$  kde/g ved dag 0 og  $9,7 \times 10^6$  kde/g ved dag 2), hvor antall kde/g var nedadgående, men

gradvis noe utflatende frem til dag 29. Gjennom resten av forsøksperioden lå antallet jevnt noe over  $10^4$  kde/g og ved forsøkets slutt (dag 64) lå det på ca.  $9,2 \times 10^3$  kde/g. I autoklavert og ikke-autoklavert jord mangler det datapunkter ved dag én fordi det ble laget feil fortynningsrekke, slik at det ikke var mulig å telle antall kolonier (Figur 16).

Det kunne se ut som *E. coli* stammene D1292 og D2798 hadde nokså lik utvikling også i jord. Her var det også en tendens til at D2798 hadde en raskere reduksjon i ikke-autoklavert jord enn D1292.



Figur 16 Persistens hos *E. coli* D2798 med antall kde per gram jord (y-aksen har logaritmisk skala, men med y-verdier på standardform) over en tidsperiode på 10 uker (x-aksen) i autoklavert jord (oransje) og ikke-autoklavert jord (blå). Usikkerhetsstolpene viser  $\pm$  ett standardavvik basert på tre paralleller (N=3). Se tallverdier i Vedlegg 10.

Forskjellene mellom de tre parallellene for D2798 i persistensforsøket i jord, tyder på relativt lav og ikke noen systematisk forskjell i usikkerheten mellom autoklavert og ikke-autoklavert vann utfra standardavviket. Det er heller ikke noe som tyder på at usikkerheten har endret seg gjennom forsøksperioden. Ved dag 36 for ikke-autoklavert jord var standardavviket spesielt

høyt. Dette skyldes at de to agarskålene som kunne telles viste 1 og 56 kolonier, mens den tredje agarskålen ikke kunne telles på grunn av dårlig spredning.

Det var vekst på de negative kontrollene på MC-cefo agarskålene ved starten (dag 0), midten (dag 16) og slutten (dag 64) av forsøksperioden. Dette var forårsaket av en feil ved oppstart. Det ble ved en feiltakelse tilsatt overnatt-kultur (fra en av inokulat-stammene) i de negative kontrollene med autoklavert og ikke-autoklavert jord. Utvalgte kolonier ble undersøkt med PCR som bekreftet dette. Det ble også gjort en ny screening av plantejorden, autoklavert og ikke-autoklavert, etter at det viste seg at de negative kontrollene var positive, men denne screeningen bekreftet at jorda var uten vekst av cefalosporin-resistente *E. coli*.

### 3.3.3 Verifisering av isolater fra persistensforsøkene

Forsøksoppsettene og resultatene fra alle verifiseringene er vist i Vedlegg 3. Koloniene ble verifisert ved riktig fylotype, henholdsvis A eller D og positivt resultat for *bla<sub>CMY-2</sub>*. Verifiserte kolonier er ikke omtalt videre i denne teksten, men det henvises til Vedlegg 3.

For persistensforsøk i autoklavert vann ble kolonien PAV 3 (persistens autoklavert vann, D2798 dag 0) ikke verifisert. Den hadde fylotype A, men det ble ikke påvist *bla<sub>CMY-2</sub>*. Sannsynligvis skyldes dette en pipetteringsfeil ved oppsettet av real-time PCR platen ved at det muligvis ikke ble tilsatt noe DNA i denne brønnen. For koloniene PAV 61 (persistens autoklavert vann D1292 dag 64) og PAV 63 (persistens autoklavert vann D2798 dag 64) ble det ikke utført fylotyping, men kjørt MALDI-TOF og real-time PCR. Det ble påvist *E. coli* ved MALDI-TOF og positivt resultat ved *bla<sub>CMY-2</sub>*. For ikke-autoklavert vann ble koloniene PV 62 (persistens ikke-autoklavert vann D1292 dag 64) og PV 64 (persistens ikke-autoklavert vann D2798 dag 64) verifisert på samme måte og med samme resultat. Disse siste fire koloniene ble verifisert på en annen måte enn hoveddelen av koloniene og nevnes derfor her, men anses fremdeles som de korrekte isolatene.

For persistensforsøket i autoklavert og ikke-autoklavert jord ble alle koloniene verifisert.

For de negative kontrollene ved persistensforsøket i autoklavert og ikke-autoklavert jord ble koloniene undersøkt. Kolonien PAJ 29 (persistens autoklavert jord, negativ kontroll dag 16) viste resultatet fylotype A og var positiv for *bla<sub>CMY-2</sub>*, mens for NK P 5 (persistens autoklavert jord, negativ kontroll dag 64) var det vanskelig å bestemme fylotype grunnet et ekstra bånd som

ikke passet inn i tolkningsskjemaet (Tabell 2). Den var imidlertid positiv for *bla<sub>CMY-2</sub>*. Det ble undersøkt fire ulike kolonier fra de negative kontrollene med ikke-autoklavert jord fra dag 16. Tre av disse, NK P 1-3, var fylotype A og positive for *bla<sub>CMY-2</sub>*. For den fjerde kolonien PJ 30 ble ingen av de aktuelle båndene påvist ved fylotyping. Imidlertid ble det påvist *bla<sub>CMY-2</sub>*. Den siste negative kontrollen av ikke-autoklavert jord som ble tatt ut ved dag 64, viste fylotype A og det ble påvist *bla<sub>CMY-2</sub>*. Det tyder på at donorstammen D2798 ble tilsatt i de negative kontrollene med autoklavert og ikke-autoklavert jord.

## 4 DISKUSJON

I denne oppgaven ble det undersøkt hvorvidt to ulike cefalosporin-resistente *E. coli* stammer (D1292 og D2798) kunne persistere og overføre AMR-plasmider i vann og jord ved simulert norsk sommertemperatur på 15 °C. For å ha et sammenligningsgrunnlag og få en bedre forståelse av hastigheten på overføringen av AMR-plasmidene ved optimale vekstbetingelser ble konjugasjonsforsøkene også gjennomført ved høyere temperaturer. Både konjugasjons- og persistensforsøkene ble gjennomført i plantejord og vann fra Årungen (både autoklavert og ikke-autoklavert).

Et hovedfunn var at begge bakteriestammene, D1292 og D2798, persisterte godt i både vann og jord over en periode på 10 uker når temperaturen var 15 °C. Samtidig kunne det ikke påvises plasmidoverføring ved tilsvarende temperatur og i samme matrikser i konjugasjonsforsøkene. *E. coli* er en robust fakultativt aerob tarmbakterie som overlever godt i miljøet. Selv om den trives best i tarmen hos mennesker og dyr hvor forholdene er stabile, har den en enorm evne til å overleve i mer ustabile omgivelser i det ytre miljøet, inkludert vann og jord. Her vil alt fra temperatur, pH, tilgang til næring, oksygen og omkringliggende mikrobielle samfunn variere stort (Blount, 2015), og studier har vist at *E. coli* kan etablere seg som en del av mikrobielle samfunn i vann, jord og planter (Texier et al., 2008; Berthe et al., 2013; Dublan et al., 2014). I persistensforsøkene var forholdene stabile gjennom hele forsøksperioden og både D1292 og D2798 persisterte godt. Det kan tenkes at stammene ikke ville persistert like godt i det ytre miljøet der forholdene er mer svingende. Selv om de to *E. coli* stammene persisterte lenge, ble det ikke påvist overføring av AMR-plasmider i de tilsvarende konjugasjonsforsøkene ved temperaturene 15 og 20 °C hverken for vann eller jord over en periode på to uker. Headd &

Bradford (2020) gjennomførte en studie hvor de så på konjugasjonsvinduet i en *E. coli* stamme med et IncF-II plasmid i LB-buljong. De spekulerte rundt at tilgangen på næring i ulike matrikser kan spille en større rolle for at konjugasjon skal kunne skje enn temperatur. *E. coli* har evnen til å vokse i et temperaturspekter på ca. 8-42 °C (Headd & Bradford, 2020). Konjugasjonsforsøkene som ble gjort i forbindelse med denne masteroppgaven viste en kobling mellom optimal veksttemperatur og plasmidoverføring. I tillegg vil tilgangen til næring spille en stor rolle. I konjugasjonsforsøkene gjort i LB-buljong ble det påvist konjugasjon ved alle temperaturene 15, 20 og 37 °C. I en slik buljong vil *E. coli* ha bedre tilgang til næring enn i de andre matriksene vann og jord. I en lignende konjugasjonsstudie gjort av Mo et al. (2017), hvor de samme resipient- og donorstammene ble brukt, ble det påvist plasmidoverføringer på agarskåler, i buljong og i biofilm ved 25 °C og 37 °C. De observerte ingen plasmidoverføring ved 12 °C, og viser til at rapporteringer har funnet at lave temperaturer i buljong reduserer plasmidoverføring. Det kan tenkes at det samme gjelder for plasmidoverføring ved lave temperaturer i vann og jord. Likevel er det blitt påvist overføring av plasmider helt ned til en temperatur på 8 °C (Fernandez-Astorga et al., 1992). Det kan derfor ikke utelukkes at plasmidoverføringer også kan skje under ugunstige forhold hvor det er fravær av/lav tilgang på næringsstoffer og lave temperaturer (Fernandez-Astorga et al., 1992) .

Konjugasjonsforsøkene i vann og jord ble gjennomført ved stabile forhold på en lab. I den virkelige verden vil forholdene variere betydelig mer. Headd & Bradford (2020) antydte at miljøer hvor det er episodevise fluktueringer av næringsstoffer vil kunne bidra mer til konjugasjon enn miljøer der tilgangen til næring er stabil. Økt konjugasjon som følge av stress ser ut til å være et generelt fenomen. Obolski & Hadany (2012) skriver at økt konjugasjonsfrekvens blant annet kan være en funksjon av næringsmangel, DNA skader, skifte i temperatur, eksponering for antibiotika og oksidativt stress. I naturlig vann og jord vil tilgangen til næring fluktuere i større grad da dette er åpne systemer, i motsetning til lab miljøet som i stor grad er et lukket system. Altså vil både temperatur og type matriks, og dermed næringsinnhold, kunne påvirke spredningen av AMR-plasmider i miljøet (Li & Zhang, 2022; Aminov, 2011).

Et annet viktig funn som ble observert var en signifikant ( $p < 0,005$ ) forskjell i antall bakterier i autoklavert og ikke-autoklavert vann- og jord i persistensstudien. Antallet var betydelig høyere i den autoklaverte matriksen, kontra den ikke-autoklaverte matriksen for både D1292 og D2798.



Det kan tyde på bedre persistens når *E. coli* stammene får leve i matriksen isolert, uten påvirkning av konkurranse fra det naturlige mikrobefundet.

### *Konjugasjon i vann og jord*

Siden vann fra Årungen er en udefinert matriks der innhold av næringsstoffer er ukjent, ble det også gjennomført konjugasjonsforsøk i sterilt RO-vann som er en vannmatriks med kjent innhold. I RO-vann ble det kun påvist konjugasjon ved optimale betingelser (37 °C) etter 24 timer og kun for mating D2798+R. I vann fra Årungen ble det tilsvarende påvist konjugasjon etter 24 timer og kun ved 37 °C for begge matinger. Dette gjaldt både for autoklavert og ikke-autoklavert vann. Dette resultatet kan tyde på at konjugasjon er lite sannsynlig i et typisk norsk vannmiljø der sommertemperaturen i vannet sjelden overstiger 20 °C.

Temperatur så ut til å være en viktig faktor ved konjugasjon i vann. Forekomst eller fravær av et naturlig vannlevende bakteriesamfunn (ikke-autoklavert eller autoklavert vann) så heller ikke ut til å påvirke resultatene i disse forsøkene. Pallares-Vega et al. (2021) skriver at hyppigheten av plasmidoverføringer ved konjugasjon målt under laboratorieforhold, kan føre til en overestimering av evnen til plasmidoverføring i naturlige økosystemer. Det er vanskelig å gjennomføre konjugasjonsforsøk i vann og jord som skal gjenspeile virkeligheten. I konjugasjonsforsøkene i denne oppgaven ble det ikke påvist plasmidoverføring ved lavere temperaturer (15 og 20 °C), som kunne sammenlignes med virkeligheten i vann og jord under norske forhold. Derfor kan det tenkes at det vil være enda mindre sannsynlig at plasmidoverføring hos stammene brukt i konjugasjonsforsøkene, ville skje i virkelige vann- og jordmiljøer ved tilsvarende temperaturer. Dette på grunn av at plasmidoverføring heller ikke ble påvist under stabile laboratoriebetingelser ved disse temperaturnivåene.

I studien til Pallares-Vega et al. (2021), undersøker de forskjeller i konjugasjon av plasmidet IncP-1 ved bruk av varierende temperaturer (37, 25, 15 og 9 °C) og ulike matrikser, som LB medium/buljong, syntetisk avløpsvann og jord-ekstrakt, til tre naturlige ESBL-produserende *E. coli* resipientstammer. De fant at frekvensen av plasmidoverføring sank ved lave temperaturer, men de påviste likevel plasmidoverføring ved alle temperaturene til de tre stammene. Dette indikerer at ved lavere temperaturer kreves det lengre tid før en eventuell konjugasjon opptrer. Teoretisk sett kunne det tenkes at konjugasjon hadde blitt påvist i konjugasjonsforsøkene i jord

og vann undersøkt i denne oppgaven, dersom matingperioden ble utvidet utover de to ukene forsøkene pågikk.

Et annet funn i studien til Pallares-Vega et al. (2021), var at matrikser med lavere næringsinnhold resulterte i betydelige reduksjoner i overføring av plasmider. Det var kun én av stammene som kunne påvises som transkonjugant. De fant en reduksjon i overføringsfrekvens med -3 log for syntetisk avløpsvann og -6 log for jordekstrakt sammenlignet med rikt LB medium som ga optimale vekstbetingelser. Vann fra Årungen er en matriks som sannsynligvis har et lavere næringsinnhold enn både det syntetiske avløpsvannet og jordekstraktet i studien til Pallares-Vega et al. Dermed er det trolig at frekvensen av plasmidoverføring er enda lavere i Årungen.

Dersom man sammenligner konjugasjonsforsøkene med hensyn til næringsinnhold i matriks, viste resultatene konjugasjon i LB-buljong ved alle temperaturene, mens dette ikke var tilfellet i noen av konjugasjonsforsøkene i vann. Dette kan tyde på at næringsinnhold er en viktig forutsetning for at konjugasjon skal skje når de fysiske vekstforholdene ikke er optimale. Det ble vist at konjugasjon kunne skje ved temperaturer ned til 15 °C i buljong. Dette tyder på at næringsinnhold kan være en viktig forutsetning for konjugasjon, da ingen av de mer næringsfattige matriksene, autoklavert vann, ikke-autoklavert vann eller sterilt RO-vann fikk påvist konjugasjon ved 15 eller 20 °C.

Konjugasjonsforsøkene i vann påviste ikke plasmidoverføring fra henholdsvis D1292 og D2798 til resipienten ved lavere temperaturer (15 og 20 °C). I en studie utført av Heß et. al (2020), ble evnen til plasmidopptak hos ulike *E. coli* isolater i kloakk og elvedeimenten undersøkt. Isolatene som var hentet fra kloakk, var for det meste menneske-assosierte, mens fra elvedeimentene var det mest miljø-assosierte isolater. Det ble påvist stor variasjon mellom de ulike *E. coli* isolatene i evne til plasmidopptak, men ingen signifikant forskjell mellom isolater fra de to ulike gruppene. Resipienten som ble brukt i denne oppgaven var et *E. coli* isolat fra fekal flora hos slaktekylling. Det er umulig å vite om utfallet hadde vært annerledes dersom det hadde blitt brukt en annen resipient i konjugasjonsforsøkene i vann. Ideelt sett burde flere isolater ha blitt testet, men dette var ikke mulig innenfor rammene av denne oppgaven.

Eksponering av bakteriesamfunn med antibiotika kan trigge en økt evne til konjugering. Derfor kan det tenkes at genoverføringer skjer hyppigere i vannmiljøer hvor det er antibiotikarester

(Heß et al., 2020). Ved eventuelt nye konjugasjonsforsøk i vann kunne dette blitt undersøkt videre. Da kunne for eksempel resipienten bli eksponert for ulike typer antibiotika, for å undersøke om dette ville påvirke evnen dens til å ta opp plasmid i vann ved lave temperaturer.

Antibiotikabruk i helsesektoren og landbruket kan resultere i utslipp av antibiotiske stoffer til overflatevann. I en metastudie av Monahan et al (2021), ble det referert funn av multiresistents hos flere isolater hentet fra avløpsvann fra renseanlegg ulike steder i Europa. Det ble funnet 15 forskjellige antibiotika fra ulike antibiotikaklasser i avløpsvann fra to renseanlegg i Irland (Rodriguez-Mozaz et al., 2020; Monahan et al., 2021). I avløpsvann i Norge derimot, ble det funnet svært lite antibiotika i denne undersøkelsen (Rodriguez-Mozaz et al., 2020).

Ifølge årsrapport for overvåkning av vannkvalitet i PURA (2018), der Årungen inngår som en av vannforekomstene, er det utfordringer med eutrofiering i innsjøen. Avrenning fra nærliggende landbruksarealer er en viktig årsak til dette. Siden innsjøen er sterkt landbrukspåvirket, er det en mulighet at avrenningen til Årungen kan inneholde noe antibiotika og/eller AMR bakterier. Likevel anses sannsynligheten som lav da Norge har lavt forbruk av antibiotika og lav forekomst av AMR bakterier (Urdahl et al., 2020). Kombinasjonen av lav temperatur, lite antibiotika og lite AMR bakterier reduserer trolig sannsynligheten for at konjugasjon foregår i denne innsjøen.

I konjugasjonsforsøkene med autoklavert plantejord, ble det kun påvist konjugasjon for begge matingene ved 37 °C. Det var imidlertid en betydelig forskjell i tidspunkt for når konjugasjonen inntraff mellom de to matingene. Det ble ikke påvist tilsvarende forskjell mellom de samme donorstammene og resipient ved 37 °C i LB-buljong og på agarskål i studien til Mo et al. (2017). Det er usikkert om evnen til plasmidoverføring er større hos en av donorstammene, men utfra studien til Mo et al. (2017) kan det se ut til at D1292 har evnen til å konjugere noe hyppigere enn D2798. I ikke-autoklavert plantejord ble det ikke påvist konjugasjon. Det kan tenkes at donor og resipienten ikke kom i direkte kontakt med hverandre ved tilsetning i plantejord. Grunnen er at disse ble tilsatt separat og i antatt samme punkt i jordprøven. Dette i motsetning til vannprøvene der det lettere dannes en homogen blanding av donor og resipient.

Det kan også tenkes at tilstedeværelse av naturlig mikrobiota i ikke-autoklavert plantejord vanskeliggjør forholdene for konjugasjon, siden det etter hvert vil oppstå ressursmangel på grunn av konkurranse, som kan medføre at antallet donorer og/eller resipienter reduseres over

tid. Dermed vil sannsynligheten for genoverføring bli redusert. Vekst og overlevelse av *E. coli* i et åpent miljø blir ofte begrenset av tilgjengeligheten av næringsstoffer og energikilder. I en voksende bakteriekultur vil næringsmangel oppstå som følge av begrensninger i mengde tilgjengelig karbon eller andre substrater (van Elsas et al., 2011).

I en ny studie ble det undersøkt hvorvidt ulike komponenter i jord kunne påvirke konjugasjon hos to *E. coli* stammer i jordmiljøet (Shi et al., 2023). De fant at type jord, i tillegg til eksponeringstid for ulike jordkomponenter påvirket konjugasjon. Det var særlig ulike organiske stoffer som fremmet konjugasjon i jord. Dette inkluderte humussyre, biokull og sot (Shi et al., 2023). I plantejorden som ble brukt i konjugasjonsforsøkene i denne masteroppgaven var det et innhold av 69% TS organiske stoffer (Vedlegg 1). Det kan spekuleres i at dette innholdet av organiske stoffer var gunstig for konjugasjon. Til tross for dette ble det ikke påvist konjugasjon ved noen av temperaturene for den ikke-autoklaverte plantejorden.

I konjugasjonsforsøket i LB-buljong ble det tatt ut prøver etter 4 timer ved 37 °C. Det samme gjaldt ikke for temperaturene 15 og 20 °C. Dette var fordi det var forventet at det ville ta lengre tid før plasmidoverføring ville skje ved de lavere temperaturene. Dette ble gjort kun i konjugasjonsforsøket i LB-buljong, fordi et tilsvarende forsøk hadde blitt gjennomført i en annen studie tidligere (Mo et al., 2017). Derfor var det kjent at konjugasjon mellom henholdsvis D1292 og D2798 med resipienten ville skje innen svært kort tid ved 37 °C i LB-buljong.

I konjugasjonsforsøkene i vann og jord, ble alle prøvene første gang tatt ut etter 24 timer ved alle temperaturene, fordi det ble antatt at plasmidoverføring ville ta lenger tid.

Ved filtrering av autoklavert og ikke-autoklavert vann etter to uker oppstod det et uventet funn i konjugasjonsforsøkene. Utvalgte kolonier (KAV 5, KAV 6 og KV 7) (se Vedlegg 3) viste fylotypen til D2798 og dens resistensgen ved PCR. Det er usikkert hva som var årsaken til dette, da den i utgangspunktet ikke skulle ha egenskapen til å vokse på MC-cefo+nal. Det kan tenkes at D2798 kan ha mutert og dermed ervervet kinolonresistens. Videre kan det også ha vært noe med agarskålene som ble benyttet, eksempelvis utgått på dato og for lav konsentrasjon av nalidiksinsyre. Det kan også ha vært at filtrene som ble benyttet ikke ble plassert godt nok ned på agarskålene. Disse koloniene ble ikke verifisert som transkonjuganter, men for å kunne være helt sikker på dette resultatet kunne de muligens blitt sekvensert for å gi et sikkert svar på at det faktisk var D2798 og om den eventuelt hadde mutert og blitt kinolon-resistent. Vannet var

screenet før oppstart av forsøkene, uten funn av cefalosporin- og/eller kinolonresistente *E. coli*. Koloniene som vokste på de tre agar-skålene var derfor mest sannsynlig D2798.

### *Persistens i vann og jord*

Både D1292 og D2798 persisterte godt i vann og jord ved 15 °C over forsøksperioden på 64 dager. Persistens hos cefalosporin-resistente *E. coli* i vann og jord er blitt lite undersøkt, men det er blitt gjort en del persistens studier av *E. coli* O157:H7. I en studie fra 2005, ble *E. coli* O157:H7 isolert fra melk i Polen, og dens evne til å persistere i vannmiljøer som fritt vann, bunnsedimenter og gjørmete bunnvann ble undersøkt ved 6 °C og 24 °C (Czajkowsk et al., 2005). Ved 6 °C ble det ikke detektert noen *E. coli* O157:H7 i fritt vann etter et intervall fra 32 til 51 dager. Tilsvarende ble den ikke detektert etter intervallet fra 21 til 32 dager ved 24 °C. I gjørmete bunnvann persisterte bakteriene bedre, med 49-65 dager ved 6 °C og 26-60 dager ved 24 °C. Studien viste at overlevelsen var lengst i bunnsedimentene med 73-100 dager ved 6 °C og 30-60 dager ved 24 °C. Hovedfunnet var at *E. coli* O157:H7 persisterte godt i disse tre miljøene og spesielt godt i bunnsedimenter (Czajkowsk et al., 2005).

Denne studien kan sammenlignes med persistensforsøket i vann fra Årungen og plantejord. I begge studiene ble prøver hentet fra det ytre miljøet og videre undersøkt inne på et laboratorium hvor prøvene ble inkubert. I vannet fra Årungen og plantejorden ble det vist at både D1292 og D2798 kunne persistere godt over en periode på 64 dager ved 15 °C, inntil forsøkene ble avsluttet. Til sammenligning persisterte *E. coli* O157:H7 kortere enn 64 dager i fritt vann både ved 6 og 24 °C i den polske studien. I bunnsedimenter persisterte *E. coli* O157:H7 lengre enn 64 dager ved 6 °C.

I den polske studien ble det vist at *E. coli* O157:H7 overlevde lengre i sediment enn i fritt vann (Czajkowsk et al., 2005). Dersom man anser persistensforsøkene med plantejord som et eksempel på matriksen jord/sediment i naturlige systemer viser resultatene en lignende tendens. For både D1292 og D2798 var antall kde betydelig høyere ved forsøkets slutt i ikke-autoklavert jord enn i ikke-autoklavert vann. For D1292 var antallet  $2,0 \times 10^4$  kde/g i jord og  $3,0 \times 10^2$  kde/mL i vann. Tilsvarende var antallet  $9,2 \times 10^3$  kde/g i jord og  $3,8 \times 10^2$  kde/mL i vann for D2798. Generelt var altså antallet ca. 2 log<sub>10</sub> høyere i jord enn i vann ved forsøkets slutt. Når en i tillegg tar høyde for at inokulatet var i underkant av 1 log<sub>10</sub> høyere i vann enn i jord blir forskjellen betydelig. Om en legger til grunn at høyere antall kde ved dag 64 også betyr en lengre persistens

tyder dette resultatet på at *E. coli* stammene overlever lengre i jord/sediment matriksen enn i vannmatriksen. Dette virker plausibelt gitt at jord generelt inneholder mer næringsstoffer og er en mer kompleks og strukturert matriks som gir flere mulige leveområder for bakterier sammenlignet med vann som normalt gir mindre næringstilgang og et mer homogent miljø.

I en studie fra Sveits ble det undersøkt hvor lenge ESBL-produserende *E. coli* kunne persistere i jord og salat etter å ha blitt tilsatt via gjødsel eller vann. Eksperimentene ble satt opp i drivhus under forhold for optimal salatvekst med 16 timer lys ved 20 °C og 8 timer mørke ved 15 °C gjennom døgnet (Gekenidis et al., 2020). Det ble påvist lengst persistens hos ESBL-produserende *E. coli* som ble tilsatt jorden via gjødsling. Her persisterte bakteriene i opptil ni uker, mens de persisterte bare syv dager på salaten. I prøvene hvor bakteriene ble tilsatt via vanningsvann, persisterte bakteriene en uke i jorden fra vannet med lavt nivå av ESBL-produserende *E. coli*. I jorden hvor det ble tilsatt vann med høyt nivå av *E. coli*, persisterte bakteriene i opptil to uker. Studien viste at ESBL-produserende *E. coli* kunne persistere opptil ni uker i jord når de ble tilført gjennom gjødsel (Gekenidis et al., 2020). Dette kan sammenlignes med persistensforsøket i plantejorden hvor persistensen hos D1292 og D2798 var på minimum 10 uker da forsøket ble avsluttet. Når de ESBL-produserende *E. coli* ble tilsatt jorden via vann, persisterte de mye kortere i jorden enn 10 uker.

I en annen studie fra 2011 ble det undersøkt persistens av *E. coli* O157:H7 i ulike jordtyper ved en temperatur på 10 °C. Det ble observert at bakteriene persisterte kortest i leirholdig sand (32 dager) og persisterte lengst i en type leirjord (113 dager) (Ma et al., 2011). Også disse studiene tyder på at *E. coli* kan persistere lenge i jord, selv om type jord trolig har stor betydning for overlevelse.

I en norsk studie ble *E. coli* O157:H7 sin evne til å persistere i jord når den var tilsatt via gjødsel undersøkt. Deretter ble sannsynlig overførings- og kontamineringspotensiale av isbergsalat som vokste under kontrollerte forhold i drivhus undersøkt (Johannessen et al., 2005). Jorden som ble brukt var en blanding av leire og silt. Ved høstingen av isbergsalaten ble bakterien hverken påvist på røttene eller bladene og det ble konkludert med at overføring av *E. coli* O157:H7 fra kontaminert jord til salat ikke skjedde. Til tross for dette, persisterte bakterien minst 8 uker etter å ha blitt tilsatt jorden, men bakterien kunne ikke detekteres etter 12 uker. Disse funnene kan sammenlignes med jord-persistensforsøket i denne oppgaven. Det ble i begge tilfeller vist at *E.*

*coli* (henholdsvis cefalosporin-resistente *E. coli* og *E. coli* O157:H7), kunne persistere relativt lenge i jord under simulerte norske sommertemperaturer.

Det er blitt gjennomført mange studier av persistensen til *E. coli* i ulike typer jord. De fleste har vist en persistens på 2-4 måneder (Brennan et al., 2010). Eksempelvis er det observert at *E. coli* O157:H7 kunne overleve i minst åtte uker ute i beitejord (Avery et al., 2004; Brennan et al., 2010). I tillegg ble det rapportert av Othomo et al. (2004) at *E. coli* kunne persistere i flere måneder i gressmark. Til tross for dette har studier vist at majoriteten av *E. coli* som introduseres i jord, dør i løpet av kort tid. Det spekuleres rundt at dette kan være som følge av brått miljøskifte fra forholdene inne i tarmen til et menneske/dyr og over til et jordmiljø. Her vil tilgangen til karbon være svært varierende, og bakteriene blir nødt til å regulere ned stoffskiftet for å overleve. Dette sjokket vil kunne medføre død hos de fleste *E. coli* (Brennan et al., 2010).

En mulig konsekvens av miljøskifte ble observert i persistensforsøkene i både jord og vann, hvor det etter en kort periode med vekst ble observert en tydelig nedgang i antall kde i perioden mellom dag 2 og dag 10, med litt variasjon. Denne effekten var tydeligst i ikke-autoklaver jord og vann, men kunne også observeres i autoklavert jord og vann, selv om den her var betydelig svakere.

Noen *E. coli* har evnen til å overleve som følge av fordelaktige fysiologiske egenskaper. Det kan også være *E. coli* som overlever ved at de koloniserer spesielt gunstige områder i jorden (Brennan et al., 2010). Det kan spekuleres i om de observerte resultatene kan følge av at det har oppstått mutasjoner som gir *E. coli* gunstige fysiologiske egenskaper. Dermed overtar disse vekstmediet gjennom seleksjon i etterkant av den initiale perioden, da det ble observert nedgang i antall kde. Tidsseriene fra begge persistensforsøk med autoklavert vann (homogent miljø) der D1292 og D2798 levde isolert viste en kort bratt vekstperiode rundt dag åtte. Antallet holdt seg deretter stabilt og det er grunn til å anta at systemets bæreevne ble nådd. I jord var dette ikke like tydelig.

I persistensforsøket i jord ble det fra dag 0 til dag 64 påvist ca. en faktor ti økning i antall kde/g for D1292 i autoklavert jord og tilsvarende nesten to tier potenser økning for D2798. Dette var noe uventet siden det var naturlig å anta at næringstilgangen ville bli redusert over tid. Siden jord er en kompleks matriks kan det kanskje tenkes at bakteriene fant nye energikilder underveis

i forsøksperioden. Eventuelt at dette skjedde i form av evolusjon hos de persisterende *E. coli* isolatene. Denne effekten var tydeligst i autoklavert jord. Det kan spekuleres i om den samme mekanismen ikke gjorde seg gjeldene i den ikke-autoklaverte jorden på grunn av konkurranse med de naturlige mikroorganismene.

Resultatene indikerte at D1292 persisterte betydelig bedre i autoklavert vann og jord enn ikke-autoklaverte vann og jord. Resultatene for D2798 indikerte det samme. Persistensforsøkene i både vann og jord viste det som antas å være en betydelig effekt av konkurranse med det naturlige mikrobefundet i ikke-autoklavert vann/jord matriks. Hibbing et al. (2010) viser hvordan konkurranse i både rene (autoklaverte) og blandede (ikke-autoklaverte) mikrobekulturer påvirker sammensetningen og skjebnen til mikrobefundet. I autoklavert vann/jord, der det ikke var konkurrerende mikroflora, ble det observert en kortvarig vekstfase før antall kde stabiliserte seg på et jevnt høyt nivå over resten av forsøksperioden. Dette mønsteret var svært likt hos D1292 og D2798 i både vann og jord. Ved forsøkets slutt var differansen i antall kde mellom autoklavert og ikke-autoklavert vann/jord, tilnærmet den samme mellom de to isolatene. Derimot ble det observert en viss forskjell mellom isolatene i den første delen av persistensforsøket i vann.

Ved dag åtte ble det for D1292 registrert en kde/mL på  $2,5 \times 10^5$ , mens tilsvarende antall for D2798 var på  $2,8 \times 10^4$  kde/mL, altså en faktor ti forskjell i ikke-autoklavert vann. Dette kunne indikere noe dårligere konkurransekraft hos D2798 enn hos D1292. Derimot var resultatet motsatt i ikke-autoklavert jord, der D2798 hadde ca. dobbelt så høyt antall kde/g jord ved dag åtte som D1292. Dermed er det ikke grunnlag for å trekke noen konklusjon om konkurransekraft. Det kan være like sannsynlig at denne forskjellen er et resultat av måleusikkerhet eller ikke-optimal blanding av prøven ved uttaket denne dagen.

I en studie av Semenov et al. (2007), ble persistensen hos *E. coli* O157:H7 og *Salmonella Typhimurium* undersøkt i gjødsel og laboratoriebetingelser ved både stabile temperaturer (7, 16, 23 og 33 °C) og fluktuerende temperaturer, med ulik amplitude (0,  $\pm 4$ ,  $\pm 7$  °C). Hovedfunnet var at persistensen hos begge stammene gikk ned med temperaturen og enda mere ned med økende fluktuasjon. Persistensforsøkene i masteroppgaven foregikk med stabil temperatur. Funnene til Semenov et al. kan tyde på at resultatene ikke er helt representative for naturlige forhold, ved at persistensen overestimeres noe.



## *Spredning av AMR-plasmider i et Én-helse perspektiv*

Det skjer en kontinuerlig spredning av bakterier mellom dyr, mennesker og miljøet rundt oss (Koutsoumanis et al., 2021). Viktigheten av å kartlegge spredningsveier og utvikling av AMR i alle miljøer, inkludert det ytre miljøet er blitt stadig mer anerkjent (VKM, 2022). En slik kartlegging vil kunne bidra til at en forstår spredningsveier og mekanismer bedre og dermed gi grunnlag for å sette inn effektive og målrettede tiltak.

I dag er forekomsten av cefalosporin-resistente bakterier i norsk husdyrproduksjon lav. Eksempelvis ble det i 2018 vist at <1% av kyllingflokkene og kyllingkjøttet testet positivt for cefalosporin-resistente *E. coli* som et resultat av forebyggende tiltak (Urdahl et al., 2020). Derfor vil sannsynligheten for utslipp av cefalosporin-resistens fra husdyrproduksjon til miljøet være liten i Norge.

Forskning har vist at genet *bla*<sub>CMY-2</sub> som normalt er lokalisert på IncK eller IncI plasmider, potensielt kan spres mellom cefalosporin-resistente bakterier hos fjørfe og mennesker (Berg et al., 2017). I tillegg har det også blitt vist at plasmidene IncK og IncI1 kan overføres fra *E. coli* til miljøbakterier og tilbake (Mo et al., 2017). Videre er det uklart i hvilken grad cefalosporin-resistens *E. coli* hos dyr kan overføres til mennesker, og betydningen dette har i utvikling av sykdom hos mennesker (Urdahl et al., 2020). Imidlertid har nyere forskning vist tydelige forskjeller hos *E. coli* ST38 fra mennesker og slaktekyllingproduksjonen (Mo et al., 2023). De fant en tydelig forskjell mellom de to gruppene med funn av distinkte monofyletiske grupper, i tillegg til ulikheter i cefalosporin-resistensgenene. De konkluderer dermed at utfra studien finnes det ingen indikasjoner på overføring av *E. coli* ST38 eller plasmider med *bla*<sub>CMY-2</sub> mellom menneske- og slaktekylling (Mo et al., 2023).

Videre kan det tenkes at klimaendringer som blant annet fører med seg temperaturøkninger og mer ekstremvær, vil kunne bidra til en større risiko for spredning av AMR. Høyere temperaturer kan gi bedre forhold for bakterievekst og større sannsynlighet for HGO (Kaba et al., 2020). Dette vil trolig også gjelde i ytre miljøer som jord og vann. I tillegg kan forekomsten av mer ekstremvær resultere i at mikroorganismer spres over større områder. Eksempelvis kan det spekuleres i at hyppigere flommer kan medføre en større spredning av AMR bakterier via urensset avløpsvann til naturen, når kommunale renseanlegg må gå i overløp på grunn av sprengt kapasitet.

En studie av Kaba et al. (2020), undersøkte assosiasjonen mellom AMR og klimatiske faktorer i Europa. De fant at klimaendringer med global oppvarming, kan medføre en økning av AMR-spredning. I tillegg viste studien til MacFadden et al. (2018), at AMR hos *E. coli*, *S. aureus* og *K. pneumoniae*, økte med økende lokale temperaturer i USA. I en studie av Johannessen et al. (2004), diskuteres også effekten av et varmere klima. De nevner at det er sannsynlig at antallet bakterier som persisterer og muligheten til å vokse er bedre i varmere klima. Dermed kan det tenkes at risikoen for en eventuell kontaminering av bakterier fra jord til plantemat er større ved varmere temperaturer. Dette vil nok kunne gjelde et flertall av ulike bakterier som finnes i jord og gjødsel, inkludert patogener og AMR bakterier. Et varmere klima vil kunne gi en økt sannsynlighet for kontaminering og eventuelt overføring til mennesker som spiser salat/grønnsaker som ikke er tilstrekkelig forbehandlet.

#### 4.1 Metodiske betraktninger

##### *Screening*

Screeningen av vannet fra Årungen med filtrering av det autoklaverte og ikke-autoklaverte vannet resulterte ikke i funn av kinolon- eller cefalosporin-resistente *E. coli*. Rosa kolonier med lignende morfologi som *E. coli* viste seg å være *Aeromonas sp.* Dette var ikke overraskende da *Aeromonas sp.* er en Gram-negativ bakterie som finnes naturlig i ferskvann (Chaix et al., 2017). Det er blitt påvist resistensegenskaper hos denne bakterien mot flere ulike klinisk viktige antibiotika (Skwor et al., 2020). Denne kolonien vokste inntil nalidiksinsyre-lappen på MC agarskålen, og viste dermed resistens mot denne typen kinolon antibiotikum.

Screeningen av plantejorden fra Maxbo ga heller ingen funn av kinolon- eller cefalosporin-resistente *E. coli*. Det var overvekst av diverse jordbakterier på alle screeningskålene fra de ulike fortynningene. Ingen synlige rosa kolonier ble påvist på MC-cefo agarskålene verken før eller etter oppformering, og heller ingen tydelig sone rundt nalidiksinsyre-lappene. Derfor ble screeningen godkjent. Det kan tenkes at det kunne være gunstig å ta med enda flere fortynninger ved screeningen av plantejorden for å finne de potensielt få naturlige *E. coli* til stede med samme resistensegenskaper som forsøksisolatene, da den høyeste fortynningen benyttet var  $10^{-3}$ . Alle transkonjuganter og utvalgte kolonier fra persistensforsøkene ble verifisert og undersøkt med real-time PCR og fylotype PCR, som enda en kontroll på at resultatene kom fra

forsøksisolatene, uten noen interferering eller påvirkning av den naturlige bakteriefloraen/mikrobiotaen i matriksen.

### *Deteksjonsgrense*

I screeningen av vann ble 30 mL filtrert for å senke deteksjonsgrensen til 1 kde per 30 mL vann. Denne metoden ville være mest følsom siden man da kunne analysere hele prøven. I screeningen av jord, ble 10 g jord fortynnet 1:10 ved å tilsette 90 mL BPV-ISO i en stomacherpose. Videre ble 1 mL fra stomacherposen fordelt på tre MC-cefo agarer som gav en deteksjonsgrense på 10 kde/g jord. Det ble også laget en fortynningsrekke. I ettertid av forsøket er det blitt spekulert i at fortynningsrekken burde ha inneholdt flere fortynninger, da det ble observert overvekst på alle agarskålene. For å øke følsomheten ytterligere ble stomacherposene satt til oppformering. Oppformeringen ville kunne avdekke *E. coli* (<10 kde/g) hvis antallet var under deteksjonsgrensen.

De negative kontrollene i persistensforsøkene ble undersøkt ved at 1 mL fra stomacherposen med 1:10 fortynning av jord, ble fordelt på tre MC-cefo agarskåler for å senke deteksjonsgrensen til 10 kde/g jord, i tillegg til oppformering av stomacherposen. Tilsvarende for vann ble 1 mL hentet ut direkte fra den negative kontrollen og fordelt på tre MC-cefo agarskåler for å senke deteksjonsgrensen og 1 kde/mL vann. I ettertid av forsøkene ble det konstatert at de negative kontrollene med vann burde vært filtrert slik at følsomheten hadde blitt like god som ved screeningen av vannet.

I persistensforsøkene var det tenkt at når antallet *E. coli* sank til et lavt nok nivå, skulle det tas i bruk de samme deteksjonsmetodene som nevnt over for å senke deteksjonsgrensen ytterligere. Dette var for å detektere *E. coli* der antallet var under deteksjonsgrensen for den kvantitative analysen. Ingen av disse metodene ble tatt i bruk ved uttakene, hverken for jord eller vann, siden mengden *E. coli* som persisterte ikke sank til et lavt nok nivå til at det var nødvendig. Dersom forsøksperioden hadde blitt forlenget derimot, ville det på et tidspunkt ha blitt nødvendig å ta dem i bruk.

### *Negative kontroller - persistensforsøk jord*

Persistensforsøket i jord ga positivt utslag på de negative kontrollene. Ved oppstart av forsøket var det over 200 falkonrør som skulle håndteres. Noen av rørene skulle benyttes som negative

kontroller, men ved en glipp ble det også tilsatt inokulat her. De negative kontrollene fra starten og midten av forsøksperioden fikk vekst først etter oppformering av stomacherposen. De negative kontrollene fra slutten av forsøksperioden derimot, fikk vekst på MC-cefo agarskålene før oppformering, både for autoklavert og ikke-autoklavert jord. PCR påviste fylotype A og *bla<sub>CMY-2</sub>*, samme egenskaper som D2798. Som nevnt tidligere ble det ikke påvist cefalosporin-resistente *E. coli* ved screeningen av jorden før oppstart av forsøket. I tillegg ble «original» jorden undersøkt på nytt, med samme negative resultat som den første screeningen. Derfor kan det konkluderes med at de negative kontrollene mest sannsynlig ble kontaminert med den ene donorstammen ved oppstart av forsøket som følge av pipetteringsfeil.

#### *Negative kontroller - Real-time PCR*

Ved den andre kjøringen av real-time PCR ble flere av de negative kontrollene positive, med en høy Ct-verdi (Vedlegg 5, kjøring 2). Dette var mest sannsynlig et resultat av at prøvene som skulle analyseres var svært konsentrerte og burde vært fortynnet. De konsentrerte prøvene resulterte i høy risiko for kontaminering. I en perfekt PCR-reaksjon vil en reduksjon i Ct-verdi med 1 tilsvare en dobling av konsentrasjonen. Altså vil for eksempel en prøve med Ct-verdi 12 være 2x så konsentrert som en prøve med Ct-verdi 13 (Bustin & Nolan, 2004; Kubista et al., 2006).

Det var en tydelig forskjell i Ct-verdi mellom de negative kontrollene og de andre prøvene som var forventet å bli positive. De fleste negative kontrollene hadde en Ct-verdi på >30, med unntak av én med Ct-verdi 27,25 (Vedlegg 5, kjøring 2). Alle prøvene som var forventet positive, hadde en mye lavere Ct-verdi (området 10-16).

Tabell 12. Et eksempel fra real-time PCR kjøring 2. Tabellen illustrerer den store forskjellen i Ct-verdi mellom prøvene og de negative kontrollene.

Navn på brønn	Ct ( $\Delta$ R)	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i> plasmid
Neg ktr	36,67	Negativ
Neg ktr	33,24	Negativ
PJ 14	13,07	Positiv
Neg ktr	No Ct	Negativ
PJ 36	13,43	Positiv
PAJ 43	11,05	Positiv

For å vurdere om de positive negative kontrollene kunne påvirke analyseresultatene ble en Ct forskjell på ca. 10 verdier vurdert. I en perfekt PCR-reaksjon vil denne forskjellen utgjøre 10 fordoblinger av DNA produkt konsentrasjonen (uttrykt matematisk:  $2^{10}$  som er 1024). Det er klart at når den minst konsentrerte prøven er 1000 ganger mer konsentrert enn den mest konsentrerte positive negative kontrollen, vil ikke de negative kontrollene påvirke analyseresultatet. Det mest sannsynlige vil derfor være at prøvene har forurenset de negative kontrollene. For kvantitativ PCR bruker Bustin & Nolan en terskel på 5 Ct-verdier for å akseptere et PCR-oppsett med positive negative kontroller (Bustin & Nolan, 2004). Fem Ct-verdier tilsvarer en faktor på 32 i konsentrasjon.

Det kan altså settes en terskel for hvilken Ct-verdi som kan defineres som positiv, og ved hvilken verdi det går over til å anses som et negativt resultat. Dersom en gitt Ct-verdi ligger 5-6 Ct-verdier over den definerte terskelen, vil dette indikere risiko for falskt negativt resultat (Bustin & Nolan, 2004). I mine data var Ct forskjellen 15 Ct-verdier eller mer (Vedlegg 5, kjøring 2). Derfor vil disse eksperimentene med positive negative kontroller kunne godkjennes og de negative kontrollene vil enten kunne tolkes som sanne negative, eller som sanne forurensninger som er for lave til å påvirke resultatene (Bustin & Nolan, 2004).

Ved neste real-time PCR kjøring (Vedlegg 5, kjøring 3) ble prøvene fortynnet 1000x med nukleasefritt vann, for å minimere risikoen for kontaminering.

## 5 KONKLUSJON OG VIDERE ARBEID

Selv om denne studien viste at cefalosporin-resistente *E. coli* kan persistere svært godt ved 15 °C i vann og jord, kunne det ikke påvises plasmidoverføring ved den samme temperaturen og i de samme matriksene. Basert på disse resultatene er det derfor lite sannsynlig at spredning av AMR-plasmider hos cefalosporin-resistente *E. coli* foregår i norske vann- og jordmiljøer. Det ble vist at både temperatur og matriks var viktige faktorer som påvirket konjugasjon. Resultatene tyder på at høy temperatur og høyt næringsinnhold fremmet konjugasjon. Dermed kan det konkluderes med at disse faktorene trolig vil ha en påvirkning på spredningen av AMR-plasmider i miljøet.

Videre arbeid utover denne oppgaven kan være en utvidelse av varigheten på persistensforsøkene, for å se hvor lenge bakteriene kan persistere. I tillegg kan det utføres transformasjonsforsøk for å undersøke om transformasjon kan skje under de samme forholdene som ble brukt for disse konjugasjonsforsøkene. Gjennomføring av konjugasjons- og persistensforsøkene ved et større utvalg av temperaturer og temperaturfluktuasjoner kunne også vært relevant. I tillegg kunne forsøk med flere ulike donor- og resipientstammer vært aktuelt.

Det er behov for mer omfattende studier og generell kunnskap om AMR i det ytre miljøet. I tillegg bør nye studier basere seg på standardiserte metoder, slik at de er mulige å sammenligne. Mer forskning på feltet kreves før en kan si noe om hvilke områder og spredningsveier som er spesielt viktige å overvåke med hensyn på AMR i miljøet, og hvor det bør settes inn tiltak for å begrense dette.

## 6 REFERANSER

- Alawi, M., Torrijos, T. V. & Walsh, F. (2022). Plasmid-mediated antimicrobial resistance in drinking water. *Environmental Advances*, 8, 100191.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100191>
- Aminov, R. (2011). Horizontal Gene Exchange in Environmental Microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00158>
- Avery, L., Hill, P., Killham, K. & Jones, D. (2004). *Escherichia coli* O157 survival following the surface and sub-surface application of human pathogen contaminated organic waste to soil. *SOIL BIOLOGY & BIOCHEMISTRY*, 36(12), 2101-2103.  
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.05.018>
- Berg, E. S., Wester, A. L., Ahrenfeldt, J., Mo, S. S., Slette-meås, J. S., Steinbakk, M., . . . Sunde, M. (2017). Norwegian patients and retail chicken meat share cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and IncK/*bla*<sub>CMY-2</sub> resistance plasmids. *Clin Microbiol Infect*, 23(6), 407.e409-407.e415. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.12.035>
- Berthe, T., Ratajczak, M., Clermont, O., Denamur, E. & Petit, F. (2013). Evidence for Coexistence of Distinct *Escherichia coli* Populations in Various Aquatic Environments and Their Survival in Estuary Water. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(15), 4684-4693. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.00698-13>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, 4, e05826.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Braykov, N. P., Eisenberg, J. N. S., Grossman, M., Zhang, L., Vasco, K., Cevallos, W., . . . Levy, K. (2016). Antibiotic Resistance in Animal and Environmental Samples Associated with Small-Scale Poultry Farming in Northwestern Ecuador. *mSphere*, 1(1), e00021-00015. <https://doi.org/doi:10.1128/mSphere.00021-15>
- Brennan, F. P., O'Flaherty, V., Kramers, G., Grant, J. & Richards, K. G. (2010). Long-Term Persistence and Leaching of *Escherichia coli* in Temperate Maritime Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(5), 1449-1455.  
<https://doi.org/doi:10.1128/AEM.02335-09>
- Bui, T. & Preuss, C. V. (2022). *Cephalosporins*. StatPearls [internet].  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551517/>
- Burmeister, A. R. (2015). Horizontal Gene Transfer. *Evol Med Public Health*, 2015(1), 193-194. <https://doi.org/10.1093/emph/eov018>
- Bustin, S. A. & Nolan, T. (2004). Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*, 15(3), 155-166.

- Carattoli, A. (2009). Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(6), 2227-2238.  
<https://doi.org/doi:10.1128/AAC.01707-08>
- Chaix, G., Roger, F., Berthe, T., Lamy, B., Jumas-Bilak, E., Lafite, R., . . . Petit, F. (2017). Distinct *Aeromonas* Populations in Water Column and Associated with Copepods from Estuarine Environment (Seine, France). *Frontiers in Microbiology*, 8.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01259>
- Cox, G. & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: Mechanisms, origins, challenges and solutions. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6), 287-292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.009>
- Croxatto, A., Prod'hom, G. & Greub, G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 380-407. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00298.x>
- Czajkowsk, D., Witkowska-Gwiazdowska, A. S., I & Boszczyk-Maleszak, H. H., M. (2005). Survival of *Escherichia Coli* Serotype O157:H7 in Water and in Bottom-Shore Sediments. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(4), 423-430.
- Dadgostar, P. (2019). Antimicrobial Resistance: Implications and Costs. *Infection and Drug Resistance*, 12, 3903-3910. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>
- Darkoh, C., Chappell, C., Gonzales, C. & Okhuysen, P. (2015). A rapid and specific method for the detection of indole in complex biological samples. *Appl Environ Microbiol*, 81(23), 8093-8097. <https://doi.org/10.1128/aem.02787-15>
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433.  
<https://doi.org/doi:10.1128/MMBR.00016-10>
- Doumith, M., Day, M., Hope, R., Wain, J. & Woodford, N. (2012). Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 3108-3110.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/JCM.01468-12>
- Dublan, M. d. l. A., Ortiz-Marquez, J. C. F., Lett, L. & Curatti, L. (2014). Plant-Adapted *Escherichia coli* Show Increased Lettuce Colonizing Ability, Resistance to Oxidative Stress and Chemotactic Response. *Plos one*, 9(10), e110416.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110416>
- FAO & WHO. (2019). *Joint FAO/WHO Expert Meeting in collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides-Meeting report* (Microbiological Risk Assessment Series no. 34. Rome). Food & Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization.
- Fernandez-Astorga, A., Muela, A., Cisterna, R., Iriberry, J. & Barcina, I. (1992). Biotic and abiotic factors affecting plasmid transfer in *Escherichia coli* strains. *Applied and*



- Environmental Microbiology*, 58(1), 392-398.  
<https://doi.org/doi:10.1128/aem.58.1.392-398.1992>
- Fletcher, S. (2015). Understanding the contribution of environmental factors in the spread of antimicrobial resistance. *Environ Health Prev Med*, 20(4), 243-252.  
<https://doi.org/10.1007/s12199-015-0468-0>
- Folkehelseinstituttet. (2014, 26.11.2021). *Antibiotikaresistens i Norge*. Folkehelseinstituttet.  
<https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/resistens/>
- Francino, M. P. (2012). The ecology of bacterial genes and the survival of the new. *Int J Evol Biol*, 2012, 394026. <https://doi.org/10.1155/2012/394026>
- Furuya, E. Y. & Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), 36-45.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>
- Gekenidis, M.-T., Rigotti, S., Hummerjohann, J., Walsh, F. & Drissner, D. (2020). Long-term persistence of *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in soil and lettuce after introducing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* via manure or water. *Microorganisms*, 8(11), 1646. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/microorganisms8111646>
- Grave, K., Jensen, V. F., Odensvik, K., Wierup, M. & Bangen, M. (2006). Usage of veterinary therapeutic antimicrobials in Denmark, Norway and Sweden following termination of antimicrobial growth promoter use. *Preventive Veterinary Medicine*, 75(1), 123-132. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.02.003>
- Grundmann, H., Bärwolff, S., Tami, A., Behnke, M., Schwab, F., Geffers, C., . . . Gastmeier, P. (2005). How many infections are caused by patient-to-patient transmission in intensive care units? *Critical Care Medicine*, 33(5), 946-951.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000163223.26234.56>
- Headd, B. & Bradford, S. A. (2020). The Conjugation Window in an *Escherichia coli* K-12 Strain with an IncFII Plasmid. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(17), e00948-00920. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.00948-20>
- Heß, S., Hiltunen, T., Berendonk, T. U. & Kneis, D. (2020). High variability of plasmid uptake rates in *Escherichia coli* isolated from sewage and river sediments. *Plos one*, 15(4), e0232130. <https://doi.org/https://doi.org/10.1371/journal.pone.0232130>
- Hibbing, M. E., Fuqua, C., Parsek, M. R. & Peterson, S. B. (2010). Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Microbiol*, 8(1), 15-25.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2259>
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161-182.  
<https://doi.org/doi:10.1128/CMR.00036-08>
- Johannessen, G. S., Bengtsson, G. B., Heier, B. T., Bredholt, S., Wasteson, Y. & Rørvik, L. M. (2005). Potential uptake of *Escherichia coli* O157:H7 from organic manure into

- crisphead lettuce. *Appl Environ Microbiol*, 71(5), 2221-2225.  
<https://doi.org/10.1128/aem.71.5.2221-2225.2005>
- Johannessen, G. S., Frøseth, R. B., Solemdal, L., Jarp, J., Wasteson, Y. & M. Rørvik, L. (2004). Influence of bovine manure as fertilizer on the bacteriological quality of organic Iceberg lettuce. *Journal of Applied Microbiology*, 96(4), 787-794.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02208.x>
- Johnson, T. J., Logue, C. M., Johnson, J. R., Kuskowski, M. A., Sherwood, J. S., Barnes, H. J., . . . Nolan, L. K. (2012). Associations between multidrug resistance, plasmid content, and virulence potential among extraintestinal pathogenic and commensal *Escherichia coli* from humans and poultry. *Foodborne Pathog Dis*, 9(1), 37-46.  
<https://doi.org/10.1089/fpd.2011.0961>
- Jung, B. & Hoilat, G. J. (2022). MacConkey Medium. I *StatPearls*. StatPearls Publishing  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557394/>
- Kaba, H. E. J., Kuhlmann, E. & Scheithauer, S. (2020). Thinking outside the box: Association of antimicrobial resistance with climate warming in Europe – A 30 country observational study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 223(1), 151-158. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2019.09.008>
- Knudsen, P. K., Gammelsrud, K. W., Alfsnes, K., Steinbakk, M., Abrahamsen, T. G., Müller, F. & Bohlin, J. (2018). Transfer of a *bla*<sub>CTX-M-1</sub>-carrying plasmid between different *Escherichia coli* strains within the human gut explored by whole genome sequencing analyses. *Scientific Reports*, 8(1), 280. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-18659-2>
- Koga, V. L., Maluta, R. P., da Silveira, W. D., Ribeiro, R. A., Hungria, M., Vespero, E. C., . . . Kobayashi, R. K. T. (2019). Characterization of CMY-2-type beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolated from chicken carcasses and human infection in a city of South Brazil. *BMC Microbiology*, 19(1), 174. <https://doi.org/10.1186/s12866-019-1550-3>
- Koutsoumanis, K., Allende, A., Álvarez-Ordóñez, A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., . . . Peixe, L. (2021). Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *Efsa j*, 19(6), e06651.  
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6651>
- Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonák, J., Lind, K., . . . Zoric, N. (2006). The real-time polymerase chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2), 95-125. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.007>
- Kümmerer, K. (2003). Significance of antibiotics in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), 5-7. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg293>
- Legemiddelhåndbok, N. (2022, 2022). *Cefalosporiner*.  
<https://www.legemiddelhandboka.no/L1.2.4/Cefalosporiner>

- Li, Q., Chang, W., Zhang, H., Hu, D. & Wang, X. (2019). The Role of Plasmids in the Multiple Antibiotic Resistance Transfer in ESBLs-Producing *Escherichia coli* Isolated From Wastewater Treatment Plants. *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00633>
- Li, W. & Zhang, G. (2022). Detection and various environmental factors of antibiotic resistance gene horizontal transfer. *Environmental Research*, 212, 113267. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113267>
- Lima, T., Domingues, S. & Da Silva, G. J. (2020). Manure as a Potential Hotspot for Antibiotic Resistance Dissemination by Horizontal Gene Transfer Events. *Veterinary Sciences*, 7(3), 110.
- Ma, J., Ibekwe, A. M., Yi, X., Wang, H., Yamazaki, A., Crowley, D. E. & Yang, C.-H. (2011). Persistence of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Mutants in Soils. *Plos one*, 6(8), e23191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023191>
- MacFadden, D. R., McGough, S. F., Fisman, D., Santillana, M. & Brownstein, J. S. (2018). Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature Climate Change*, 8(6), 510-514. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0161-6>
- MacGowan, A. & Macnaughton, E. (2017). Antibiotic resistance. *Medicine*, 45(10), 622-628. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>
- Mackenzie, J. S. & Jeggo, M. (2019). The One Health Approach-Why Is It So Important? *Trop Med Infect Dis*, 4(2), 88. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4020088>
- Miljødirektoratet. (2019). *Årsrapport for Miljødirektoratet (M-1651 2020)*. Miljødirektoratet
- Mo, S., Fiskebeck, E., Slettemeås, J., Lagesen, K., Nilsson, O., Naseer, U., . . . Sunde, M. (2023). *Escherichia coli* multilocus sequence type 38 from humans and broiler production represent distinct monophyletic groups. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1173287>
- Mo, S. S., Norström, M., Slettemeås, J. S., Løvland, A., Urdahl, A. M. & Sunde, M. (2014). Emergence of AmpC-producing *Escherichia coli* in the broiler production chain in a country with a low antimicrobial usage profile. *Veterinary Microbiology*, 171(3), 315-320. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.02.002>
- Mo, S. S., Slettemeås, J. S., Berg, E. S., Norström, M. & Sunde, M. (2016). Plasmid and Host Strain Characteristics of *Escherichia coli* Resistant to Extended-Spectrum Cephalosporins in the Norwegian Broiler Production. *Plos one*, 11(4), e0154019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154019>
- Mo, S. S., Sunde, M., Ilag, H. K., Langsrud, S. & Heir, E. (2017). Transfer Potential of Plasmids Conferring Extended-Spectrum-Cephalosporin Resistance in *Escherichia coli* from Poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(12), e00654-00617. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.00654-17>

- Monahan, C., Nag, R., Morris, D. & Cummins, E. (2021). Antibiotic residues in the aquatic environment - current perspective and risk considerations. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*, 56(7), 733-751.  
<https://doi.org/10.1080/10934529.2021.1923311>
- Nesse, L. L., Forfang, K., Stenrød, M., Slettemeås, J. S., Tessema, G. T., Hagen, S., . . . Eiken, H. G. (2021). *Antimikrobiell resistens i terrestrisk miljø* (Rapport 49 - 2021/M-2112|2021). Veterinærinstituttet.
- Nicolaou, K. C. & Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *The Journal of Antibiotics*, 71(2), 153-184.  
<https://doi.org/10.1038/ja.2017.62>
- NORM/NORM-VET. (2012). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. UNN & VI.
- NORM/NORM-VET. (2021). *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway* (Årsrapport 2021). Norsk overvåkingsystem for antibiotikaresistens hos mikrober
- Norman, A., Hansen, L. H. & Sørensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1527), 2275-2289. <https://doi.org/doi:10.1098/rstb.2009.0037>
- Obolski, U. & Hadany, L. (2012). Implications of stress-induced genetic variation for minimizing multidrug resistance in bacteria. *BMC Medicine*, 10(1), 89.  
<https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-89>
- Ohtomo, R., Minato, K. & Saito, M. (2004). Survival of *Escherichia coli* in a field amended with cow feces slurry. *SOIL SCIENCE AND PLANT NUTRITION*, 50(4), 575-581.  
<https://doi.org/10.1080/00380768.2004.10408514>
- Oliveira, N., Gonçalves, B., Lee, S., Oliveira, C. & Corassin, C. (2020). Use of antibiotics in animal production and its impact on human health. *Journal of Food Chemistry and Nanotechnology*, 6(01), 40-47. <https://doi.org/https://doi.org/10.17756/jfcn.2020-082>
- Pallares-Vega, R., Macedo, G., Brouwer, M. S. M., Hernandez Leal, L., van der Maas, P., van Loosdrecht, M. C. M., . . . Schmitt, H. (2021). Temperature and Nutrient Limitations Decrease Transfer of Conjugative IncP-1 Plasmid pKJK5 to Wild *Escherichia coli* Strains. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.656250>
- Pfeifer, Y., Cullik, A. & Witte, W. (2010). Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*, 300(6), 371-379.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.04.005>
- Philippon, A., Arlet, G. & Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-Determined AmpC-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(1), 1-11.  
<https://doi.org/doi:10.1128/AAC.46.1.1-11.2002>

- Puangsee, J., Prathan, R., Srisanga, S., Angkittitrakul, S. & Chuanchuen, R. (2022). Plasmid profile analysis of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from pigs, pork and humans. *Epidemiol Infect*, 150, e110. <https://doi.org/10.1017/s0950268822000814>
- PURA. (2018). *Overvåking av vannkvalitet i PURA*. PURA vannområde Follo/Oslo. [https://pura.no/wp-content/uploads/2019/09/Kortversjon-%C3%85RSRAPPORT-208-rev07\\_ENDELIG\\_20191003.pdf](https://pura.no/wp-content/uploads/2019/09/Kortversjon-%C3%85RSRAPPORT-208-rev07_ENDELIG_20191003.pdf)
- Riber, L., Poulsen, P. H. B., Al-Soud, W. A., Skov Hansen, L. B., Bergmark, L., Brejnrod, A., . . . Sørensen, S. J. (2014). Exploring the immediate and long-term impact on bacterial communities in soil amended with animal and urban organic waste fertilizers using pyrosequencing and screening for horizontal transfer of antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Ecology*, 90(1), 206-224. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12403>
- Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., . . . Manaia, C. M. (2020). Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environment International*, 140, 105733. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105733>
- Rosenblatt-Farrell, N. (2009). The landscape of antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*, 117(6), A244-250. <https://doi.org/10.1289/ehp.117-a244>
- Schmidt, G. V., Møllerup, A., Christiansen, L. E., Ståhl, M., Olsen, J. E. & Angen, Ø. (2015). Sampling and Pooling Methods for Capturing Herd Level Antibiotic Resistance in Swine Feces using qPCR and CFU Approaches. *Plos one*, 10(6), e0131672. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131672>
- Semenov, A. V., van Bruggen, A. H. C., van Overbeek, L., Termorshuizen, A. J. & Semenov, A. M. (2007). Influence of temperature fluctuations on *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in cow manure. *FEMS Microbiology Ecology*, 60(3), 419-428. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00306.x>
- Shi, H., Hu, X., Xu, J., Hu, B., Ma, L. & Lou, L. (2023). Conjugation-mediated transfer of antibiotic resistance genes influenced by primary soil components and underlying mechanisms. *Science of The Total Environment*, 865, 161232. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161232>
- Singer, A. C., Shaw, H., Rhodes, V. & Hart, A. (2016). Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Frontiers in Microbiology*, 7(1728). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01728>
- Skwor, T., Stringer, S., Haggerty, J., Johnson, J., Duhr, S., Johnson, M., . . . Stemme, M. (2020). Prevalence of Potentially Pathogenic Antibiotic-Resistant *Aeromonas spp.* in Treated Urban Wastewater Effluents versus Recipient Riverine Populations: a 3-Year Comparative Study. *Appl Environ Microbiol*, 86(3). <https://doi.org/10.1128/aem.02053-19>



- Smet, A., Rasschaert, G., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Butaye, P., . . . Heyndrickx, M. (2011). In situ ESBL conjugation from avian to human *Escherichia coli* during cefotaxime administration. *Journal of Applied Microbiology*, 110(2), 541-549. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04907.x>
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C. & Cruz, F. d. I. (2010). Mobility of Plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 434-452. <https://doi.org/doi:10.1128/MMBR.00020-10>
- Sokal, R. R. & Rohlf, J. F. (2000). *Biometry* (3. utg.). W.H. Freeman and Company.
- Soucy, S. M., Huang, J. & Gogarten, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, 16(8), 472-482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>
- Steinbakk, M., Sunde, M., Urdahl, A. M., Barkbu, K. N., Sørum, H., Lunestad, B.-T., . . . Bjørnholt, J. V. (2014). Antibiotikaresistens-kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak. Folkehelseinstituttet. <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2014/2014-antibiotikaresistens.pdf>
- Tan, S. Y. & Tatsumura, Y. (2015). Alexander Fleming (1881-1955): Discoverer of penicillin. *Singapore Med J*, 56(7), 366-367. <https://doi.org/10.11622/smedj.2015105>
- Tao, S., Chen, H., Li, N., Wang, T. & Liang, W. (2022). The Spread of Antibiotic Resistance Genes In Vivo Model. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2022, 3348695. <https://doi.org/10.1155/2022/3348695>
- Texier, S., Prigent-Combaret, C., Gourdon, M. H., Poirier, M. A., Faivre, P., Dorioz, J. M., . . . Trevisan, D. (2008). Persistence of Culturable *Escherichia coli* Fecal Contaminants in Dairy Alpine Grassland Soils. *Journal of Environmental Quality*, 37(6), 2299-2310. <https://doi.org/https://doi.org/10.2134/jeq2008.0028>
- Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), 711-721. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1234>
- UNEP. (2023). *Bracing for Superbugs: Strengthening environmental action in the One Health response to antimicrobial resistance*. United Nations Environment Programme. <https://www.unep.org/resources/superbugs/environmental-action>
- Urdahl, A. M., Grøntvedt, C. A., Holst-Jensen, A., Johannessen, G., Kaldhusdal, M., Lagesen, K., . . . Sunde, M. (2020). Antimikrobiell resistens hos dyr og i mat – status i Norge i 2020 (Veterinærinstituttets rapportserie 20-2020 ). Veterinærinstituttet.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., . . . Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(18), 5649-5654. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>

- van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R. & Trevors, J. T. (2011). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME Journal*, 5(2), 173-183. <https://doi.org/10.1038/ismej.2010.80>
- VKM. (2020). *Assessment of the impact of wastewater and sewage sludge treatment methods on antimicrobial resistance* (VKM Report 2020: 08). Vitenskapskomiteen for mat og miljø.
- VKM. (2022). *Surveillance of antimicrobial resistance in the environment* ( VKM Report 2022: 28). Vitenskapskomiteen for mat og miljø. [https://vkm.no/download/18.3e4ac86a183b2bfe5e54893b/1665479322812/Surveillance%20of%20antimicrobial%20resistance%20in%20the%20environment\\_VKM%20Report%202022\\_28.pdf](https://vkm.no/download/18.3e4ac86a183b2bfe5e54893b/1665479322812/Surveillance%20of%20antimicrobial%20resistance%20in%20the%20environment_VKM%20Report%202022_28.pdf)
- von Wintersdorff, C. J., Penders, J., van Niekerk, J. M., Mills, N. D., Majumder, S., van Alphen, L. B., . . . Wolffs, P. F. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol*, 7, 173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>
- Waseem, H., Williams, M. R., Stedtfeld, R. D. & Hashsham, S. A. (2017). Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environment Research*, 89(10), 921-941. <https://doi.org/https://doi.org/10.2175/106143017X15023776270179>
- WEF. (2017, 24.12.2017). *Three-quarters of antibiotics are used on animals. Here`s why that`s a major problem*. World Economic Forum. <https://www.weforum.org/agenda/2017/11/three-quarters-of-antibiotics-are-used-on-animals-heres-why-thats-a-major-problem>
- WHO. (2019). *Ten threats to global health in 2019*. Hentet 16.04.2023 fra <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>
- WHO. (2022, 03.10.2022). *One health*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/one-health#:~:text=One%20Health%20is%20an%20integrated,the%20number%20of%20malaria%20cases>.
- Williams, M. R., Stedtfeld, R. D., Guo, X. & Hashsham, S. A. (2016). Antimicrobial Resistance in the Environment. *Water Environment Research*, 88(10), 1951-1967. <https://doi.org/https://doi.org/10.2175/106143016X14696400495974>
- Winokur, P. L., Vonstein, D. L., Hoffman, L. J., Uhlenhopp, E. K. & Doern, G. V. (2001). Evidence for transfer of CMY-2 AmpC beta-lactamase plasmids between *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from food animals and humans. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(10), 2716-2722. <https://doi.org/10.1128/aac.45.10.2716-2722.2001>
- Zamudio, R., Boerlin, P., Beyrouthy, R., Madec, J.-Y., Schwarz, S., Mulvey, M. R., . . . Mather, A. E. (2022). Dynamics of extended-spectrum cephalosporin resistance genes in *Escherichia coli* from Europe and North America. *Nature Communications*, 13(1), 7490. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34970-7>

## 7 VEDLEGG

### Vedlegg 1. Innholdsdeklarasjon for plantejord kjøpt på Maxbo

Stoff	Mengde (enhet)
Organisk innhold	69% TS
Tørrstoff	183 g/L
Kompaktert labdensitet	348 kg/m <sup>3</sup>
Finfordelingsgrad	Middels
Ammonium-N (NO-3)	100 mg/L
Nitrat-N (NH-4)	122 mg/L
Fosfor-P	42 mg/L
Kalium-K	244 mg/L
Kalsium-Ca	188 mg/L
Magnesium-Mg	77 mg/L
Natrium-Na	50 mg/L
Svovel-S	146 mg/L
Bor-B	1,4 mg/L
Kobolt-Ko	<0,1 mg/L
Jern-Fe	207 mg/L
Mangan-Mn	38 mg/L
Molybden-Mo	<0,2 mg/L
Aluminium-Al	94 mg/L
Bly-Pb	<2,0 mg/kg TS
Sink-Zn	71 mg/kg TS
Kvikksølv-Hg	0,04 mg/kg TS
Kadmium-Cd	0,12 mg/kg TS
Krom-Cr	3,78 mg/kg TS
Nikkel-Ni	2,98 mg/kg TS
Kobber-Cu	<0,8 mg/kg TS



Arsen-As	19,98 mg/kg TS
Surhetsgrad-pH	5,9
El. Konduktivitet Ledetall	35 mS/m
Volum	40 L
Mattilsynet reg nr:	6580
Kvalitetsklasse:	0

Vedlegg 2. Oversikt over uttak for persistensforsøket i autoklavert og ikke-autoklavert jord for begge isolatene

Uttak		1292		2798		Totalt
		Ikke-autoklavert	Autoklavert	Ikke-autoklavert	Autoklavert	
		15 °C	15 °C	15 °C	15 °C	
Uke 1	Dag 0 (Inokulat)	3*	3	3	3	12
	Dag 1	3	3	3	3	12
	Dag 2	3	3	3	3	12
	Dag 3	3	3	3	3	12
Uke 2	Dag 6	3	3	3	3	12
	Dag 8	3	3	3	3	12
	Dag 10	3	3	3	3	12
Uke 3	Dag 14	3	3	3	3	12
	Dag 16	3	3	3	3	12
Uke 4	Dag 21	3	3	3	3	12
	Dag 23	3	3	3	3	12
Uke 5	Dag 29	3	3	3	3	12
Uke 6	Dag 36	3	3	3	3	12
Uke 7	Dag 43	3	3	3	3	12
Uke 8	Dag 50	3	3	3	3	12
Uke 9	Dag 57	3	3	3	3	12
Uke 10	Dag 64	3	3	3	3	12
Totalt		51	51	51	51	204

\*Tallene i cellene viser antall prøver

### Vedlegg 3. Oversiktstabell med resultater fra alle PCR-analysene

Forsøk	PCR ID	Forklaring	Fylotype	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i>	Verifisert (ja/nei)
	1	Positiv kontroll Bæ 14	B2	NA	Ja
	2	Resipient 6927-5	B1	-	Ja
	3	D1298	D	+	Ja
	4	D2798	A	+	Ja
Konjugasjon buljong	KB 1	D1292+R6927-5, 37 °C (4t)	B1	+	Ja
Konjugasjon buljong	KB 2	D2798+R6927-5, 37°C (4t)	B1	+	Ja
Konjugasjon buljong	KB 3	D2798+R6927-5, 20°C (24t)	B1	+	Ja
Konjugasjon buljong	KB 4	D2798+R6927-5, 20°C (48t)	B1	+	Ja
Konjugasjon buljong	KB 5	D1292+R6927-5, 20 °C (48t)	D	+	Nei
Konjugasjon buljong	KB 6	D1292+R6927-5, 15°C (48t)	B1	+	Ja
Konjugasjon buljong	KB 7	D1292+R6927-5, 20 °C (72t)	B1	+	Ja
Konjugasjon buljong	KB 8	D1292+R6927-5, 15°C (72t)	B1	+	Ja
Konjugasjon buljong	KB 9	D2798+R6927-5, 15°C (72t)	B1	+	Ja
Konjugasjon RO-vann	KRO 1	D2798+R6927-5, 37 °C (24t)	B1	+	Ja
Konjugasjon autoklavert vann	KAV 2	D1292+R6927-5, 37 °C (24 t)	B1	+	Ja
Konjugasjon autoklavert vann	KAV 4	D2798+R6927-5, 37 °C (24t)	B1	+	Ja
Konjugasjon autoklavert vann	KAV 5	D2798+R6927-5, 15 °C (mating stått to uker med filtrering)	A	+	Nei
Konjugasjon autoklavert vann	KAV 6	D2798+R6927-5, 20 °C (mating stått to uker med filtrering)	A	+	Nei
Konjugasjon ikke-autoklavert vann	KV 1	D1292+R6927-5, 37 °C (24 t)	B1	+	Ja
Konjugasjon ikke-autoklavert vann	KV 3	D2798+R6927-5, 37 °C (24t)	B1	+	Ja

Konjugasjon ikke-autoklavert vann	KV 7	D2798+R6927-5, 15 °C (mating stått to uker med filtrering)	A	+	Nei
Konjugasjon autoklavert jord	KAJ 1	D2798+R6927-5, 37 °C (24 t)	B1	+	Ja
Konjugasjon autoklavert jord	KAJ 2	D2798+R6927-5, 37 °C (48 t)	B1	+	Ja
Konjugasjon autoklavert jord	KAJ 3	D2798+R6927-5, 37 °C (48 t) (utypisk koloni)	Ingen	-	Nei
Konjugasjon autoklavert jord	KAJ 4	D2798+R6927-5, 37 °C (72 t)	B1	+	Ja
Konjugasjon autoklavert jord	KAJ 5	D1292+R6927-5, 37 °C (72 t)	B1	+	Ja
Konjugasjon ikke-autoklavert jord	KJ 6	D1292+R6927-5, 20 °C (72 t) (sannsynligvis Pseudomonas sp., MALDI-TOF og real-time PCR)	NA	-	Nei*
Persistens autoklavert vann	PAV 1	D1292 dag 0	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 3	D2798 dag 0	A	-	Nei
Persistens autoklavert vann	PAV 5	D1292 dag 1	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 7	D2798 dag 1	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 9	D1292 dag 2	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 11	D2798 dag 2	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 13	D1292 dag 3	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 15	D2798 dag 3	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 17	D1292 dag 8	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 19	D2798 dag 8	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 21	D1292 dag 9	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 23	D2798 dag 9	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 25	D1292 dag 14	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 27	D2798 dag 14	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 29	D1292 dag 16	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 31	D2798 dag 16	A	+	Ja

Persistens autoklavert vann	PAV 33	D1292 dag 21	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 35	D2798 dag 21	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 37	D1292 dag 23	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 39	D2798 dag 23	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 41	D1292 dag 29	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 43	D2798 dag 29	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 45	D1292 dag 36	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 47	D2798 dag 36	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 49	D1292 dag 43	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 51	D2798 dag 43	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 53	D1292 dag 50	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 55	D2798 dag 50	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 57	D1292 dag 57	D	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 59	D2798 dag 57	A	+	Ja
Persistens autoklavert vann	PAV 61	D1292 dag 64 (MALDI-TOF og real-time PCR)	NA	+	Ja *
Persistens autoklavert vann	PAV 63	D2798 dag 64 (MALDI-TOF og real-time PCR)	NA	+	Ja *
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 2	D1292 dag 0	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 4	D2798 dag 0	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 6	D1292 dag 1	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 8	D2798 dag 1	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 10	D1292 dag 2	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 12	D2798 dag 2	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 14	D1292 dag 3	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 16	D2798 dag 3	A	+	Ja

Persistens ikke-autoklavert vann	PV 18	D1292 dag 8	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 20	D2798 dag 8	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 22	D1292 dag 9	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 24	D2798 dag 9	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 26	D1292 dag 14	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 28	D2798 dag 14	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 30	D1292 dag 16	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 32	D2798 dag 16	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 34	D1292 dag 21	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 36	D2798 dag 21	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 38	D1292 dag 23	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 40	D2798 dag 23	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 42	D1292 dag 29	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 44	D2798 dag 29	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 46	D1292 dag 36	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 48	D2798 dag 36	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 50	D1292 dag 43	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 52	D2798 dag 43	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 54	D1292 dag 50	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 56	D2798 dag 50	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 58	D1292 dag 57	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 60	D2798 dag 57	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 62	D1292 dag 64 (MALDI-TOF og real-time PCR)	NA	+	Ja*
Persistens ikke-autoklavert vann	PV 64	D2798 dag 64 (MALDI-TOF og real-time PCR)	NA	+	Ja*

Persistens autoklavert jord	PAJ 1	D1292 dag 2	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 3	D2798 dag 2	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 5	D1292 dag 3	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 7	D2798 dag 3	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 9	D1292 dag 6	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 11	D2798 dag 6	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 13	D1292 dag 8	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 15	D2798 dag 8	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 17	D1292 dag 10	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 19	D2798 dag 10	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 21	D1292 dag 14	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 23	D2798 dag 14	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 25	D1292 dag 16	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 27	D2798 dag 16	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 29	NK dag 16	A	+	**
Persistens autoklavert jord	PAJ 31	D1292 dag 21	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 33	D2798 dag 21	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 35	D1292 dag 23	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 37	D2798 dag 23	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 39	D1292 dag 29	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 41	D2798 dag 29	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 43	D1292 dag 36	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 45	D2798 dag 36	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 47	D1292 dag 43	D	+	Ja

Persistens autoklavert jord	PAJ 49	D2798 dag 43	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 51	D1292 dag 50	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 53	D2798 dag 50	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 55	D1292 dag 57	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 57	D2798 dag 57	A	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 59	D1292 dag 64	D	+	Ja
Persistens autoklavert jord	PAJ 61	D2798 dag 64	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 2	D1292 dag 2	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 4	D2798 dag 2	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 6	D1292 dag 3	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 8	D2798 dag 3	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 10	D1292 dag 6	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 12	D2798 dag 6	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 14	D1292 dag 8	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 16	D2798 dag 8	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 18	D1292 dag 10	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 20	D2798 dag 10	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 22	D1292 dag 14	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 24	D2798 dag 14	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 26	D1292 dag 16	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 28	D2798 dag 16	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 30	NK dag 16	Ingen	+	**
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 32	D1292 dag 21	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 34	D2798 dag 21	A	+	Ja



Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 36	D1292 dag 23	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 38	D2798 dag 23	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 40	D1292 dag 29	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 42	D2798 dag 29	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 44	D1292 dag 36	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 46	D2798 dag 36	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 48	D1292 dag 43	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 50	D2798 dag 43	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 52	D1292 dag 50	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 54	D2798 dag 50	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 56	D1292 dag 57	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 58	D2798 dag 57	A	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 60	D1292 dag 64	D	+	Ja
Persistens ikke-autoklavert jord	PJ 62	D2798 dag 64	A	+	Ja
Negativ kontroll persistens jord	NK P 1	Negativ kontroll ikke-autoklavert jord dag 16	A	+	**
Negativ kontroll persistens jord	NK P 2	Negativ kontroll ikke-autoklavert jord dag 16	A	+	**
Negativ kontroll persistens jord	NK P 3	Negativ kontroll ikke-autoklavert jord dag 16	A	+	**
Negativ kontroll persistens jord	NK P 4	Negativ kontroll ikke-autoklavert jord dag 64	A	+	**
Negativ kontroll persistens jord	NK P 5	Negativ kontroll autoklavert jord dag 64	A?	+	**

\*Verifisert ved MALDI-TOF og real-time PCR

\*\* Negativ kontroll

## Vedlegg 4. Resultater Multipleks PCR

Definisjoner:

KB= Konjugasjon buljong

KRO= Konjugasjon RO-vann

KAJ= Konjugasjon autoklavert jord

KJ= Konjugasjon ikke-autoklavert jord

KAV= Konjugasjon autoklavert vann

KV= Konjugasjon ikke-autoklavert vann

PAJ= Persistens autoklavert jord

PJ= Persistens ikke-autoklavert jord

NK P= Negativ kontroll persistens jord

PAV= Persistens autoklavert vann

PV= Persistens ikke-autoklavert vann

Kjøring 1) 23.09.2022

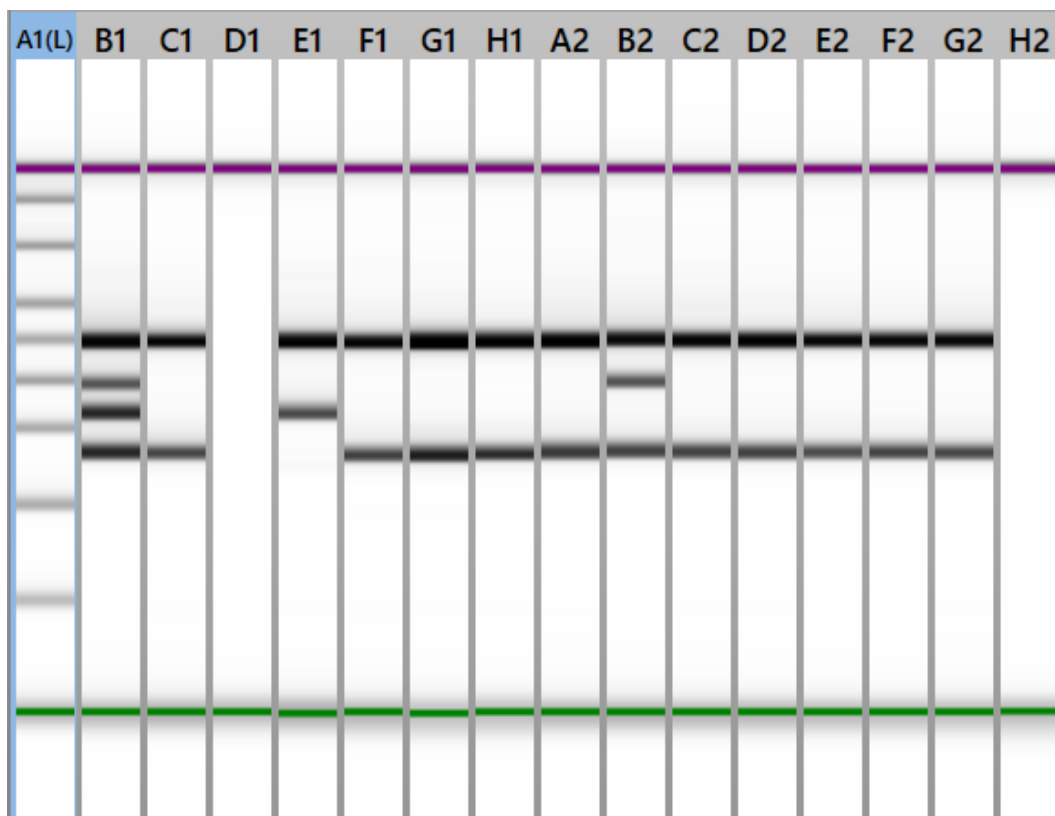
Brønn	Prøve ID	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE.C2	Resultat
A1	Ladder					
B1	1***	+	+	+	+	B2
C1	2***	+			+	B1
D1	3***	-	-	-	-	Negativ(feil)*
E1	4***	+		+		A
F1	KB1	+			+	B1
G1	KB2	+			+	B1
H1	KB3	+			+	B1
A2	KB4	+			+	B1
B2	KB5	+	+		+	D **
C2	KB6	+			+	B1
D2	KB7	+			+	B1
E2	KB8	+			+	B1
F2	KB9	+			+	B1
G2	KRO1	+			+	B1
H2	Neg ktr	-	-	-	-	Negativ

\*Ingen resultat grunnet ukjent feil

\*\*Samme fylotype som D1292 og derfor sannsynligvis ikke transkonjugant

\*\*\*1=positiv kontroll, 2=resipient, 3=D1292 og 4=D2798

TapeStation bildet under viser resultatene i tabellen over.



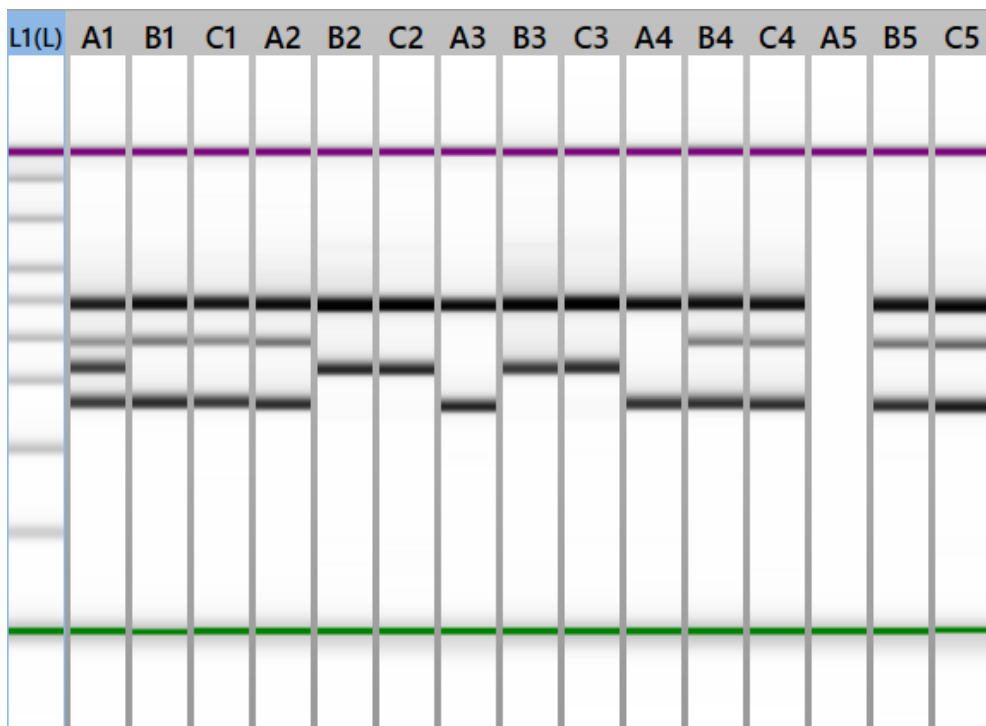
Kjøring 2) 16.11.2022

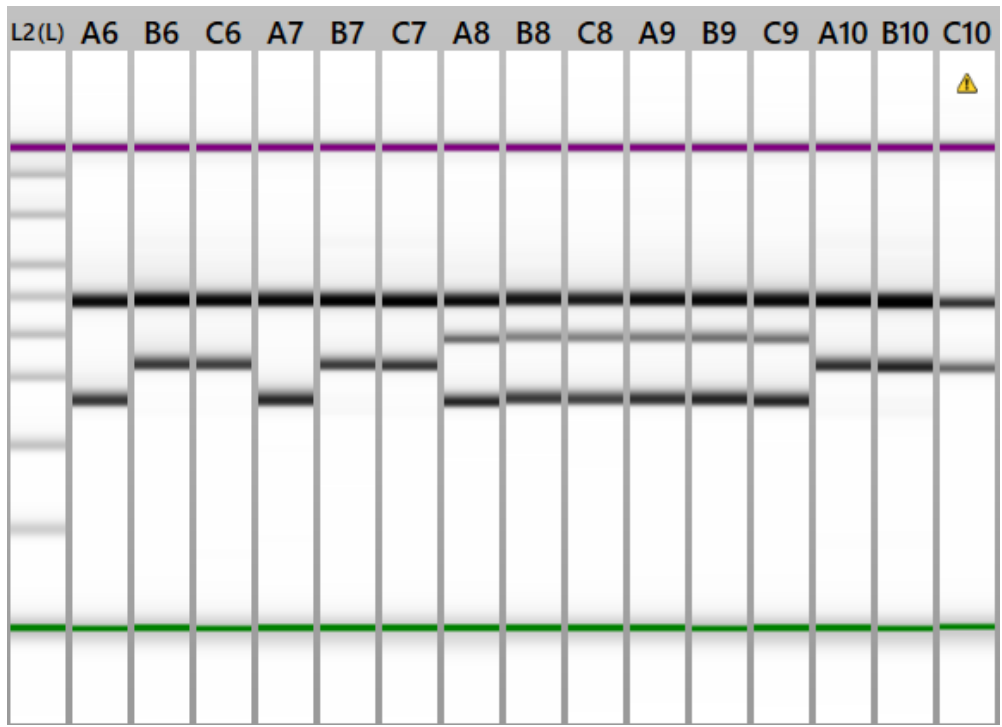
Brønn	Prøve ID	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE.C2	Resultat
A1	1 (pos ktr)	+	+	+	+	B2
B1	PJ 6	+	+		+	D
C1	PJ 18	+	+		+	D
A2	3	+	+		+	D
B2	PAJ 7	+		+		A
C2	PAJ 19	+		+		A
A3	KAJ 1	+			+	B1
B3	PJ 8	+		+		A
C3	PJ 20	+		+		A
A4	KAJ 2	+			+	B1
B4	PAJ 9	+	+		+	D
C4	PAJ 21	+	+		+	D
A5	KAJ 3	-	-	-	-	Negativ(feil)*
B5	PJ 10	+	+		+	D
C5	PJ 22	+	+		+	D
A6	KAJ 4	+			+	B1
B6	PAJ 11	+		+		A
C6	PAJ 23	+		+		A
A7	KAJ 5	+			+	B1

B7	PJ 12	+		+		A
C7	PJ 24	+		+		A
A8	PAJ 1	+	+		+	D
B8	PAJ 13	+	+		+	D
C8	PAJ 25	+	+		+	D
A9	PJ 2	+	+		+	D
B9	PJ 14	+	+		+	D
C9	PJ 26	+	+		+	D
A10	PAJ 3	+		+		A
B10	PAJ 15	+		+		A
C10	PAJ 27	+		+		A
A11	PJ 4	+		+		A
B11	PJ 16	+		+		A
C11	PJ 28	+		+		A
A12	PAJ 5	+	+		+	D
B12	PAJ 17	+	+		+	D
C12	Neg ktr	-	-	-	-	Negativ

\*ingen resultat grunnet ukjent feil

TapeStation bildet under viser resultatene i tabellen over.





## Kjøring 3) 01.12.2022

Brønn	Prøve ID	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE.C2	Resultat
A1	1 (pos ktr)	+	+	+	+	B2
B1	PAJ 29 (neg ktr)	+		+		A
C1	PJ 30 (neg ktr)	-	-	-	-	Negativ (feil?)*
D1	PAJ 31	+	+		+	D
E1	PJ 32	+	+		+	D
F1	PAJ 33	+		+		A
G1	PJ 34	+		+		A
H1	PAJ 35	+	+		+	D
A2	PJ 36	+	+		+	D
B2	PAJ 37	+		+		A
C2	PJ 38	+		+		A
D2	PAJ 39	+	+		+	D
E2	PJ 40	+	+		+	D
F2	PAJ 41	+		+		A
G2	PJ 42	+		+		A
H2	PAJ 43	+	+		+	D
A3	PJ 44	+	+		+	D
B3	PAJ 45	+		+		A
C3	PJ 46	+		+		A
D3	PAJ 47	+	+		+	D
E3	PJ 48	+	+		+	D
F3	PAJ 49	+		+		A
G3	PJ 50	+		+		A
H3	KV 1	+			+	B1
A4	KAV 2	+			+	B1
B4	KV 3	+			+	B1
C4	KAV 4	+			+	B1
D4	KAV 5	+		+		A**
E4	KAV 6	+		+		A**
F4	KV 7	+		+		A**
G4	Neg ktr	-	-	-	-	Negativ

\* Ingen resultat grunnet ukjent feil

\*\*Ikke skjedd konjugasjon, viser bare donorstammen tilsatt

Kjøring 4) 19.12.2022

Brønn	Prøve ID	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE.C2	Resultat
A1	1 (pos ktr)	+	+	+	+	B2
B1	PAJ 51	+	+		+	D
C1	PJ 52	+	+		+	D
D1	PAJ 53	+		+		A
E1	PJ 54	+		+		A
F1	PAJ 55	+	+		+	D
G1	PJ 56	+	+		+	D
H1	PAJ 57	+		+		A
A2	PJ 58	+		+		A
B2	PAJ 59	+	+		+	D
C2	PJ 60	+	+		+	D
D2	PAJ 61	+		+		A
E2	PJ 62	+		+		A
F2	NK P 1	+		+		A
G2	NK P 2	+		+		A
H2	NK P 3	+		+		A
A3	NK P 4	+		+		A
B3	NK P 5	+		+	+	A? *
C3	Neg ktr	-	-	-	-	Negativ

\*Usikker tolkning

## Kjøring 5) 17.02.2023

Brønn	Prøve ID	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE.C2	Resultat
A1	1 (pos ktr)	+	+	+	+	B2
B1	NK 4 P	+		+		A
C1	NK 5 P	+		+	+	A?*
D1	PAV 1	+	+		+	D
E1	PV 2	+	+		+	D
F1	PAV 3	+		+		A
G1	PV 4	+		+		A
H1	PAV 5	+	+		+	D
A2	PV 6	+	+		+	D
B2	PAV 7	+		+		A
C2	PV 8	+		+		A
D2	PAV 9	+	+		+	D
E2	PV 10	+	+		+	D
F2	PAV 11	+		+		A
G2	PV 12	+		+		A
H2	PAV 13	+	+		+	D
A3	PV 14	+	+		+	D
B3	PAV 15	+		+		A
C3	PV 16	+		+		A
D3	PAV 17	+	+		+	D
E3	PV 18	+	+		+	D
F3	PAV 19	+		+		A
G3	PV 20	+		+		A
H3	PAV 21	+	+		+	D
A4	PV 22	+	+		+	D
B4	PAV 23	+		+		A
C4	PV 24	+		+		A
D4	PAV 25	+	+		+	D
E4	PV 26	+	+		+	D



F4	PAV 27	+		+		A
G4	PV 28	+		+		A
H4	PAV 29	+	+		+	D
A5	PV 30	+	+		+	D
B5	PAV 31	+		+		A
C5	PV 32	+		+		A
D5	PAV 33	+	+		+	D
E5	PV 34	+	+		+	D
F5	PAV 35	+		+		A
G5	PV 36	+		+		A
H5	PAV 37	+	+		+	D
A6	PV 38	+	+		+	D
B6	PAV 39	+		+		A
C6	PV 40	+		+		A
D6	PAV 41	+	+		+	D
E6	PV 42	+	+		+	D
F6	PAV 43	+		+		A
G6	PV 44	+		+		A
H6	Neg ktr	-	-	-	-	Negativ

\*Usikker tolkning

## Kjøring 6) 17.03.2023

Brønn	Prøve ID	<i>gadA</i>	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TSPE.C2	Resultat
A1	1 (pos ktr)	+	+	+	+	B2
B1	PAV 45	+	+		+	D
C1	PV 46	+	+		+	D
D1	PAV 47	+		+		A
E1	PV 48	+		+		A
F1	PAV 49	+	+		+	D
G1	PV 50	+	+		+	D
H1	PAV 51	+		+		A
A2	PV 52	+		+		A
B2	PAV 53	+	+		+	D
C2	PV 54	+	+		+	D
D2	PAV 55	+		+		A
E2	PV 56	+		+		A
F2	PAV 57	+	+		+	D
G2	PV 58	+	+		+	D
H2	PAV 59	+		+		A
A3	PV 60	+		+		A
B3	Neg ktr	-	-	-	-	Negativ

## Vedlegg 5. Real-time PCR rådata

Kjøring 1) 10.11.2022

Well	Well Name	Target	Threshold( $\Delta R$ )	Ct ( $\Delta R$ )	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> plasmid
A1	3	FAM	21,116	12,08	Positiv
A2	4	FAM	21,116	12,91	Positiv
A3	KAJ 1	FAM	21,116	13,38	Positiv
A4	KAJ 2	FAM	21,116	14,93	Positiv
A5	KAJ 3	FAM	21,116	No Ct	Negativ
A6	KAJ 4	FAM	21,116	14,39	Positiv
A7	KAJ 5	FAM	21,116	12,72	Positiv
A8	Neg ktr	FAM	21,116	No Ct	Negativ

Kjøring 2) 09.12.2022

Well	Well Name	Target	Threshold ( $\Delta R$ )	Ct ( $\Delta R$ )	<i>bla</i> <sub>CMY-2</sub> plasmid
A1	3 (pos ktr D1292)	FAM	15,13938752	12,53	Positiv
A2	KB 6	FAM	15,13938752	14,91	Positiv
A3	KV 3	FAM	15,13938752	13,24	Positiv
A4	PAJ 3	FAM	15,13938752	14,18	Positiv
A5	PJ 10	FAM	15,13938752	12,43	Positiv
A6	PAJ 17	FAM	15,13938752	12,52	Positiv
A7	PJ 24	FAM	15,13938752	14,93	Positiv
A8	PAJ 31	FAM	15,13938752	12,68	Positiv
A9	Neg ktr	FAM	15,13938752	33,91	Negativ
A10	PJ 46	FAM	15,13938752	13,92	Positiv
A11	PAJ 53	FAM	15,13938752	13,3	Positiv
B1	2 (resipient)	FAM	15,13938752	32,97	Negativ
B2	KB 7	FAM	15,13938752	11,93	Positiv
B3	KAV 4	FAM	15,13938752	12,72	Positiv
B4	PJ 4	FAM	15,13938752	15,96	Positiv
B5	Neg ktr	FAM	15,13938752	No Ct	Negativ
B6	PJ 18	FAM	15,13938752	13,51	Positiv
B7	PAJ 25	FAM	15,13938752	13,24	Positiv
B8	PJ 32	FAM	15,13938752	12,17	Positiv
B9	PAJ 39	FAM	15,13938752	10,91	Positiv
B10	PAJ 47	FAM	15,13938752	13,37	Positiv
B11	PJ 54	FAM	15,13938752	13,09	Positiv
C1	Neg ktr	FAM	15,13938752	32,83	Negativ
C2	KB 8	FAM	15,13938752	13,27	Positiv

C3	KAV 5	FAM	15,13938752	13,2	Positiv
C4	PAJ 5	FAM	15,13938752	13,02	Positiv
C5	PAJ 11	FAM	15,13938752	13,74	Positiv
C6	PAJ 19	FAM	15,13938752	13,74	Positiv
C7	PJ 26	FAM	15,13938752	12,58	Positiv
C8	PAJ 33	FAM	15,13938752	15,8	Positiv
C9	PJ 40	FAM	15,13938752	12,74	Positiv
C10	PJ 48	FAM	15,13938752	12,83	Positiv
C11	KJ 6	FAM	15,13938752	42,74	Negativ
D1	KB 1	FAM	15,13938752	12,5	Positiv
D2	KB 9	FAM	15,13938752	14,25	Positiv
D3	KAV 6	FAM	15,13938752	14,84	Positiv
D4	PJ 6	FAM	15,13938752	13,37	Positiv
D5	PJ 12	FAM	15,13938752	13,11	Positiv
D6	PJ 20	FAM	15,13938752	13,58	Positiv
D7	PAJ 27	FAM	15,13938752	15,8	Positiv
D8	PJ 34	FAM	15,13938752	15,86	Positiv
D9	PAJ 41	FAM	15,13938752	13,71	Positiv
D10	Neg ktr	FAM	15,13938752	35,35	Negativ
D11	NK 1 P	FAM	15,13938752	14,79	Positiv
E1	KB 2	FAM	15,13938752	13,33	Positiv
E2	Neg ktr	FAM	15,13938752	27,25	Negativ
E3	KV 7	FAM	15,13938752	13,38	Positiv
E4	PAJ 7	FAM	15,13938752	13,89	Positiv
E5	PAJ 13	FAM	15,13938752	13,53	Positiv
E6	PAJ 21	FAM	15,13938752	11,6	Positiv
E7	PJ 28	FAM	15,13938752	16,54	Positiv
E8	PAJ 35	FAM	15,13938752	14,94	Positiv
E9	PJ 42	FAM	15,13938752	13,97	Positiv
E10	PAJ 49	FAM	15,13938752	14,73	Positiv
E11	NK 2 P	FAM	15,13938752	12,85	Positiv
F1	KB 3	FAM	15,13938752	13,05	Positiv
F2	KRO 1	FAM	15,13938752	11,65	Positiv
F3	Neg ktr	FAM	15,13938752	36,67	Negativ
F4	Neg ktr	FAM	15,13938752	33,24	Negativ
F5	PJ 14	FAM	15,13938752	13,07	Positiv
F6	Neg ktr	FAM	15,13938752	No Ct	Negativ
F7	PAJ 29 (NK aut dag 16)	FAM	15,13938752	16,07	Positiv
F8	PJ 36	FAM	15,13938752	13,43	Positiv
F9	PAJ 43	FAM	15,13938752	11,05	Positiv
F10	PJ 50	FAM	15,13938752	15,18	Positiv
F11	NK 3 P	FAM	15,13938752	13,9	Positiv
G1	KB 4	FAM	15,13938752	12,1	Positiv
G2	KV 1	FAM	15,13938752	11,73	Positiv
G3	PAJ 1	FAM	15,13938752	11,82	Positiv

G4	PJ 8	FAM	15,13938752	14,67	Positiv
G5	PAJ 15	FAM	15,13938752	13,23	Positiv
G6	PJ 22	FAM	15,13938752	13,05	Positiv
G7	PJ 30 (NK Ikke-aut dag 1)	FAM	15,13938752	12,78	Positiv
G8	PAJ 37	FAM	15,13938752	15,13	Positiv
G9	PJ 44	FAM	15,13938752	12,56	Positiv
G10	PAJ 51	FAM	15,13938752	10,58	Positiv
G11	Neg ktr	FAM	15,13938752	No Ct	Negativ
H1	KB 5	FAM	15,13938752	12,01	Positiv
H2	KAV 2	FAM	15,13938752	11,79	Positiv
H3	PJ 2	FAM	15,13938752	12,05	Positiv
H4	PAJ 9	FAM	15,13938752	12	Positiv
H5	PJ 16	FAM	15,13938752	15,19	Positiv
H6	PAJ 23	FAM	15,13938752	15,49	Positiv
H7	Neg ktr	FAM	15,13938752	No Ct	Negativ
H8	PJ 38	FAM	15,13938752	14,63	Positiv
H9	PAJ 45	FAM	15,13938752	13,9	Positiv
H10	PJ 52	FAM	15,13938752	10,29	Positiv

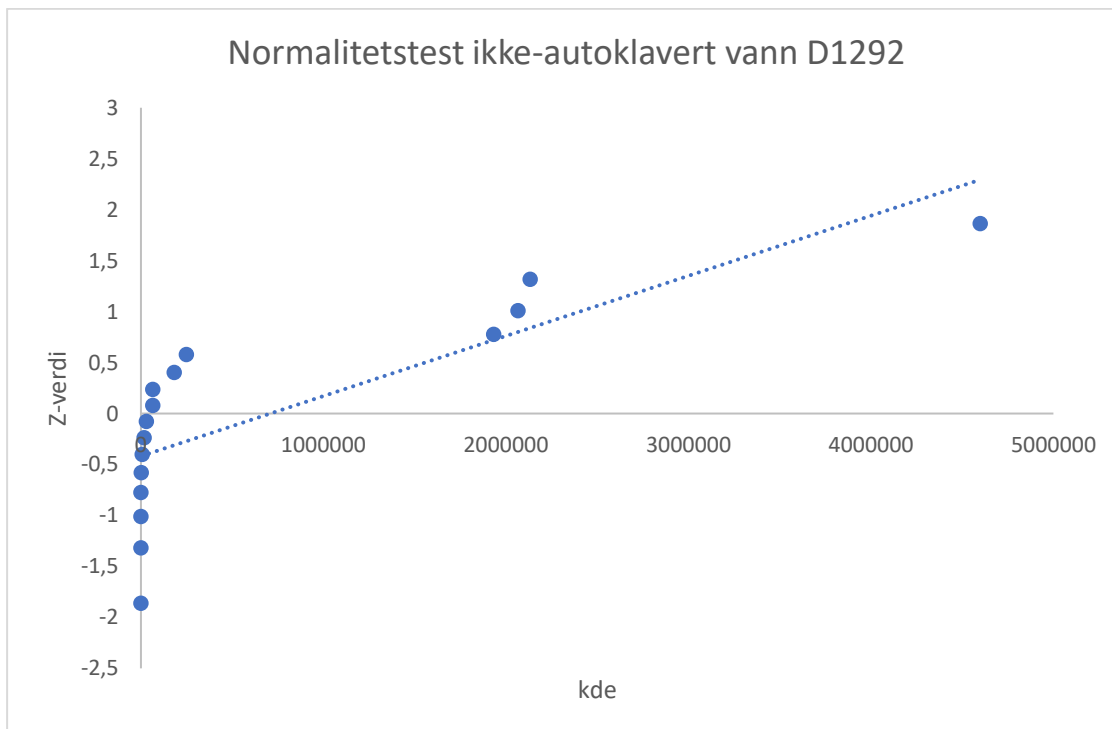
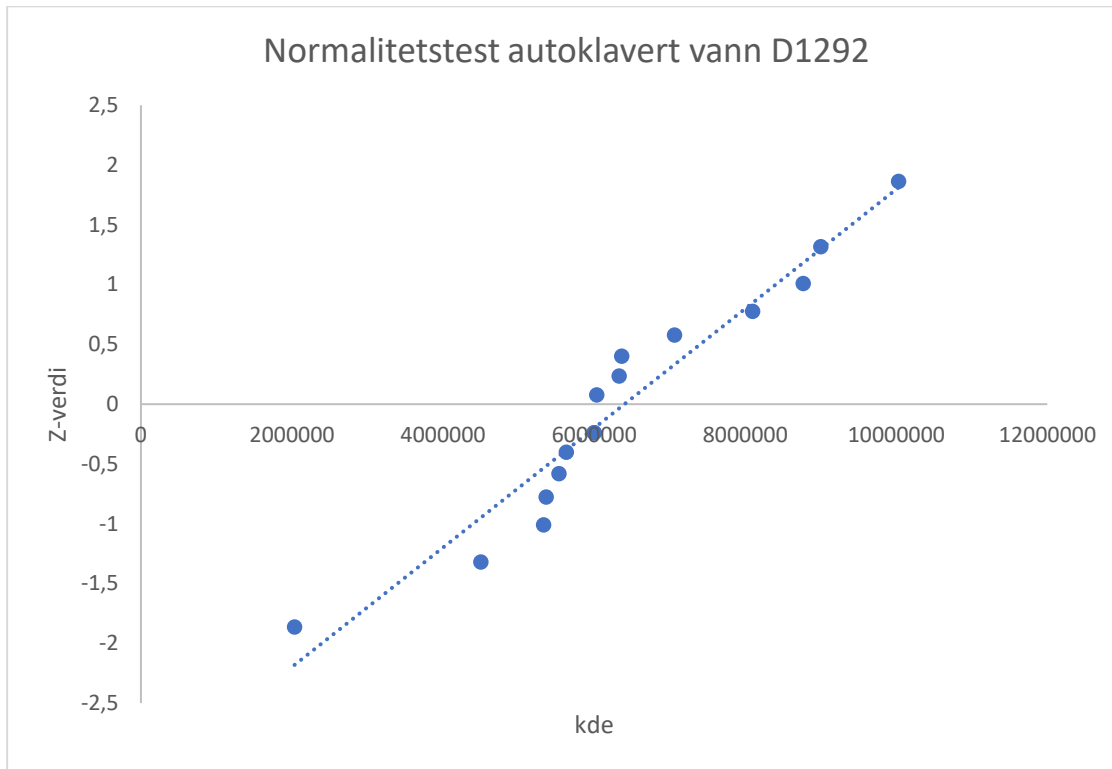
Kjøring 3) 22.03.2023

Well	Well Name	Target	Threshold ( $\Delta R$ )	Ct ( $\Delta R$ )	<i>bla<sub>CMY-2</sub></i> plasmid
A1	3 (Pos ktr D1292)	FAM	17,48800684	18,54	Positiv
B1	PAJ 55	FAM	17,48800684	18,37	Positiv
C1	PJ 56	FAM	17,48800684	17,57	Positiv
D1	PAJ 57	FAM	17,48800684	18,07	Positiv
E1	PJ 58	FAM	17,48800684	19,37	Positiv
F1	PAJ 59	FAM	17,48800684	19,08	Positiv
G1	PJ 60	FAM	17,48800684	19,62	Positiv
H1	PAJ 61	FAM	17,48800684	23,11	Positiv
A2	PJ 62	FAM	17,48800684	22,22	Positiv
B2	NK P 4	FAM	17,48800684	18,85	Positiv
C2	NK P 5	FAM	17,48800684	24,03	Positiv
D2	PAV 1	FAM	17,48800684	20,81	Positiv
E2	PV 2	FAM	17,48800684	19,69	Positiv
F2	PAV 3	FAM	17,48800684	No Ct	Negativ
G2	PV 4	FAM	17,48800684	22,31	Positiv
H2	PAV 5	FAM	17,48800684	19,79	Positiv
A3	PV 6	FAM	17,48800684	18,17	Positiv
B3	PAV 7	FAM	17,48800684	21,62	Positiv
C3	PV 8	FAM	17,48800684	19,8	Positiv
D3	PAV 9	FAM	17,48800684	23,49	Positiv
E3	PV 10	FAM	17,48800684	19,27	Positiv
F3	PAV 11	FAM	17,48800684	24,26	Positiv
G3	PV 12	FAM	17,48800684	26,81	Positiv

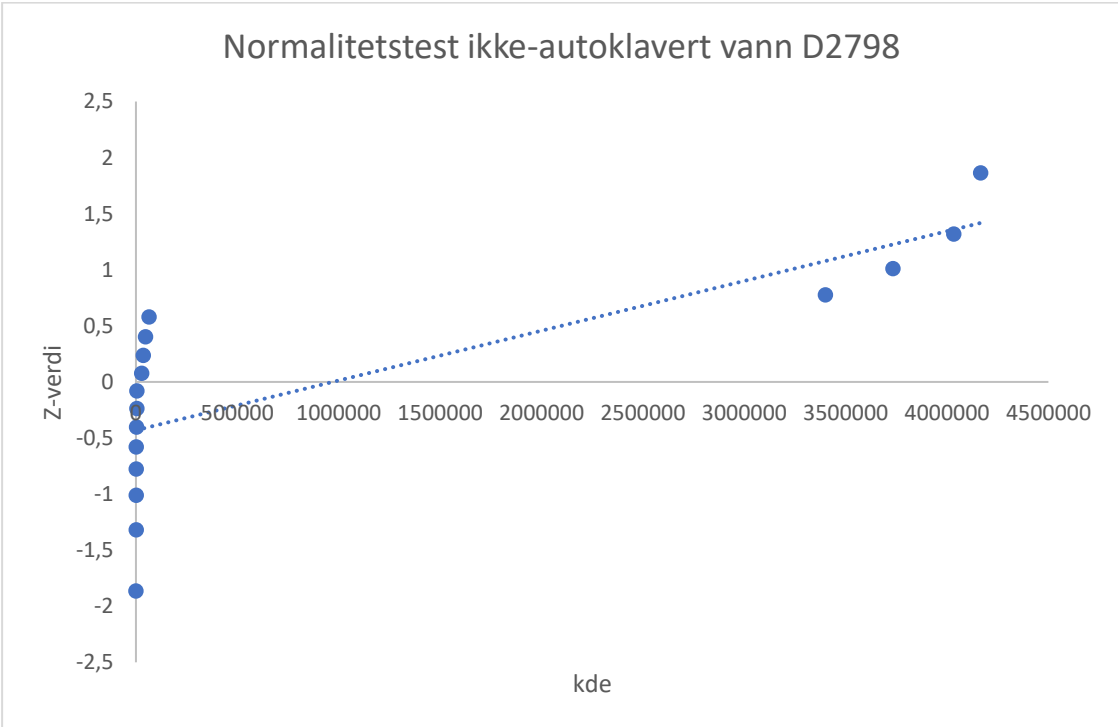
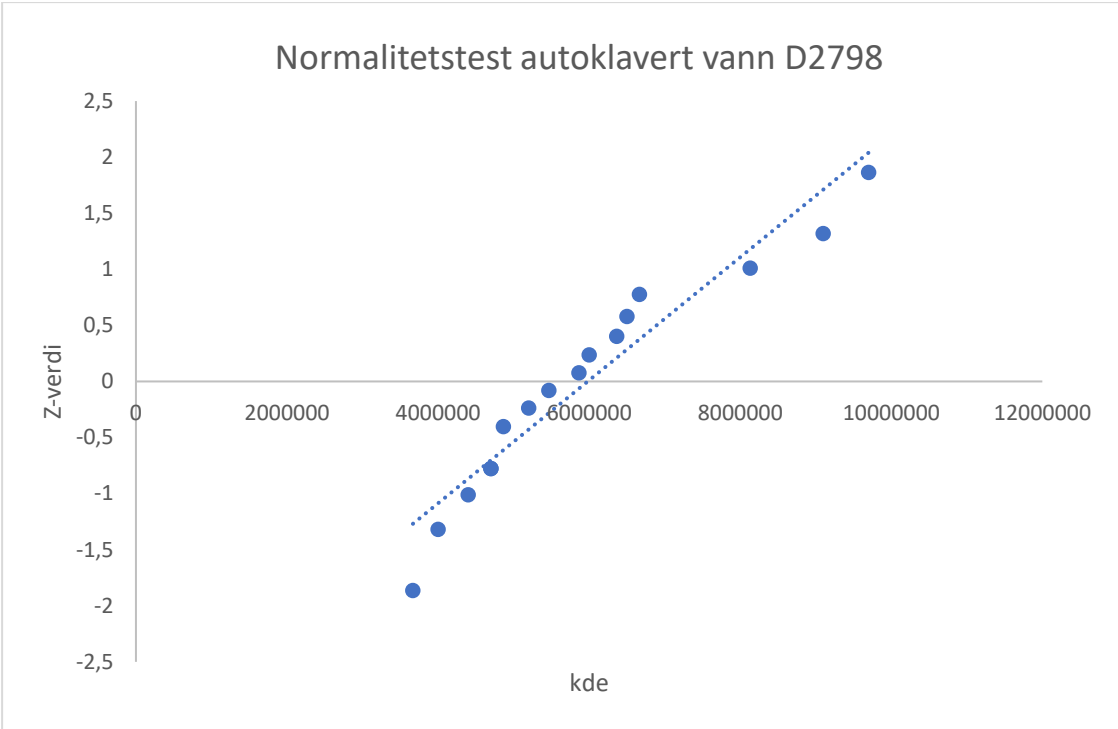
H3	PAV 13	FAM	17,48800684	19,77	Positiv
A4	PV 14	FAM	17,48800684	23,29	Positiv
B4	PAV 15	FAM	17,48800684	20,89	Positiv
C4	PV 16	FAM	17,48800684	24,26	Positiv
D4	PAV 17	FAM	17,48800684	22,19	Positiv
E4	PV 18	FAM	17,48800684	21,25	Positiv
F4	PAV 19	FAM	17,48800684	23,79	Positiv
G4	PV 20	FAM	17,48800684	24,23	Positiv
H4	PAV 21	FAM	17,48800684	22,35	Positiv
A5	PV 22	FAM	17,48800684	19,22	Positiv
B5	PAV 23	FAM	17,48800684	21,88	Positiv
C5	PV 24	FAM	17,48800684	23,75	Positiv
D5	PAV 25	FAM	17,48800684	18,29	Positiv
E5	PV 26	FAM	17,48800684	21,16	Positiv
F5	PAV 27	FAM	17,48800684	19,88	Positiv
G5	PV 28	FAM	17,48800684	21,86	Positiv
H5	PAV 29	FAM	17,48800684	18,07	Positiv
A6	PV 30	FAM	17,48800684	17,81	Positiv
B6	PAV 31	FAM	17,48800684	24,42	Positiv
C6	PV 32	FAM	17,48800684	19,36	Positiv
D6	PAV 33	FAM	17,48800684	18,51	Positiv
E6	PV 34	FAM	17,48800684	17,9	Positiv
F6	PAV 35	FAM	17,48800684	19,87	Positiv
G6	PV 36	FAM	17,48800684	19,78	Positiv
H6	PAV 37	FAM	17,48800684	18,5	Positiv
A7	PV 38	FAM	17,48800684	18,77	Positiv
B7	PAV 39	FAM	17,48800684	22,36	Positiv
C7	PV 40	FAM	17,48800684	21,05	Positiv
D7	PAV 41	FAM	17,48800684	19,27	Positiv
E7	PV 42	FAM	17,48800684	20,85	Positiv
F7	PAV 43	FAM	17,48800684	24,35	Positiv
G7	PV 44	FAM	17,48800684	21,04	Positiv
H7	PAV 45	FAM	17,48800684	17,89	Positiv
A8	PV 46	FAM	17,48800684	18,52	Positiv
B8	PAV 47	FAM	17,48800684	18,56	Positiv
C8	PV 48	FAM	17,48800684	19,03	Positiv
D8	PAV 49	FAM	17,48800684	18,38	Positiv
E8	PV 50	FAM	17,48800684	18,8	Positiv
F8	PAV 51	FAM	17,48800684	18,42	Positiv
G8	PV 52	FAM	17,48800684	20,25	Positiv
H8	PAV 53	FAM	17,48800684	19,22	Positiv
A9	PV 54	FAM	17,48800684	19,15	Positiv
B9	PAV 55	FAM	17,48800684	19,84	Positiv
C9	PV 56	FAM	17,48800684	20,83	Positiv
D9	PAV 57	FAM	17,48800684	19,69	Positiv

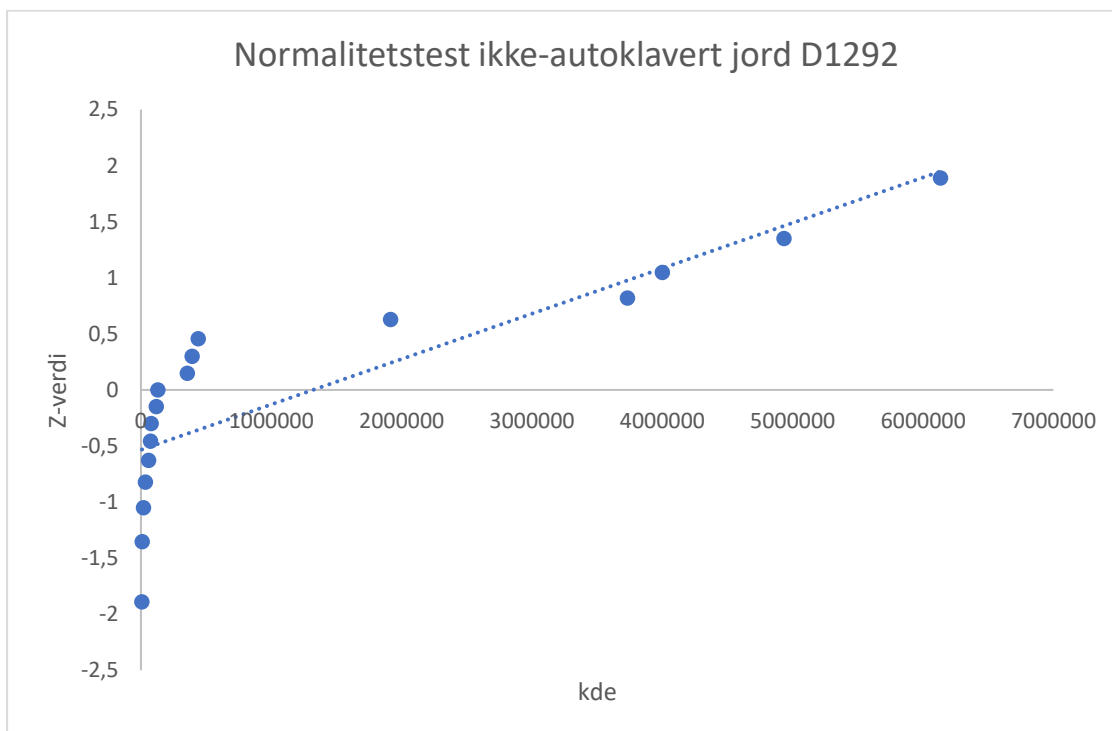
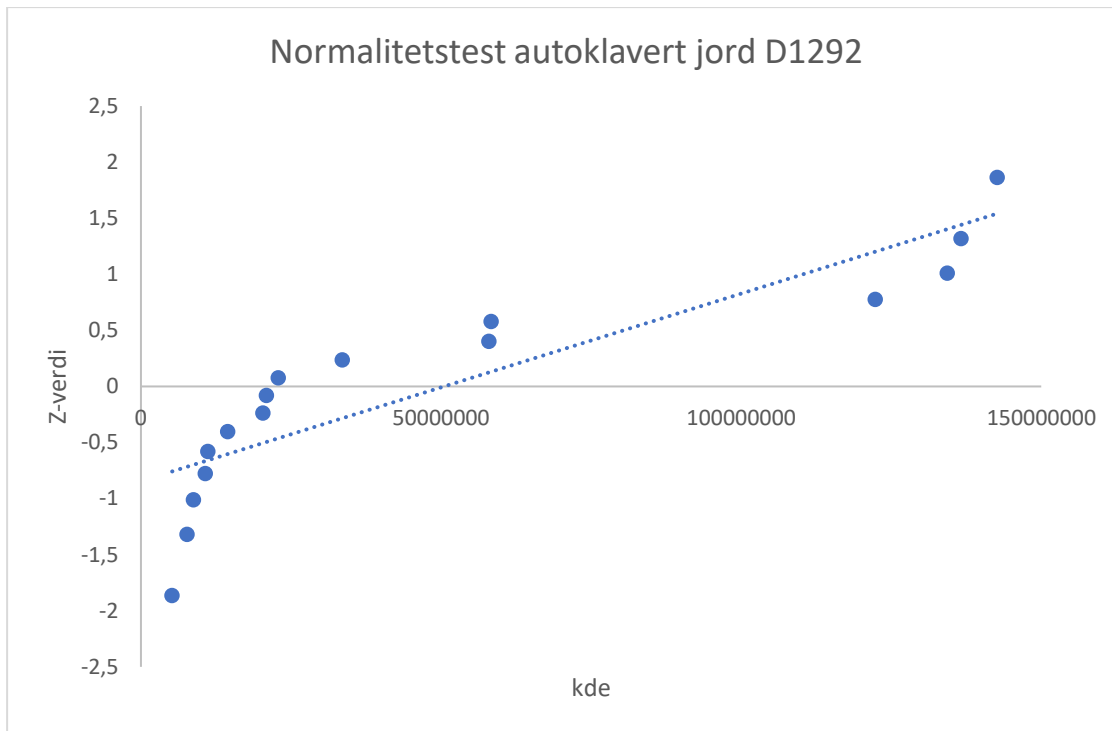
E9	PV 58	FAM	17,48800684	20,74	Positiv
F9	PAV 59	FAM	17,48800684	21,32	Positiv
G9	PV 60	FAM	17,48800684	21,9	Positiv
H9	PAV 61	FAM	17,48800684	20,12	Positiv
A10	PV 62	FAM	17,48800684	20,47	Positiv
B10	PAV 63	FAM	17,48800684	23,76	Positiv
C10	PV 64	FAM	17,48800684	21,94	Positiv
D10	Neg ktr	FAM	17,48800684	No Ct	Negativ

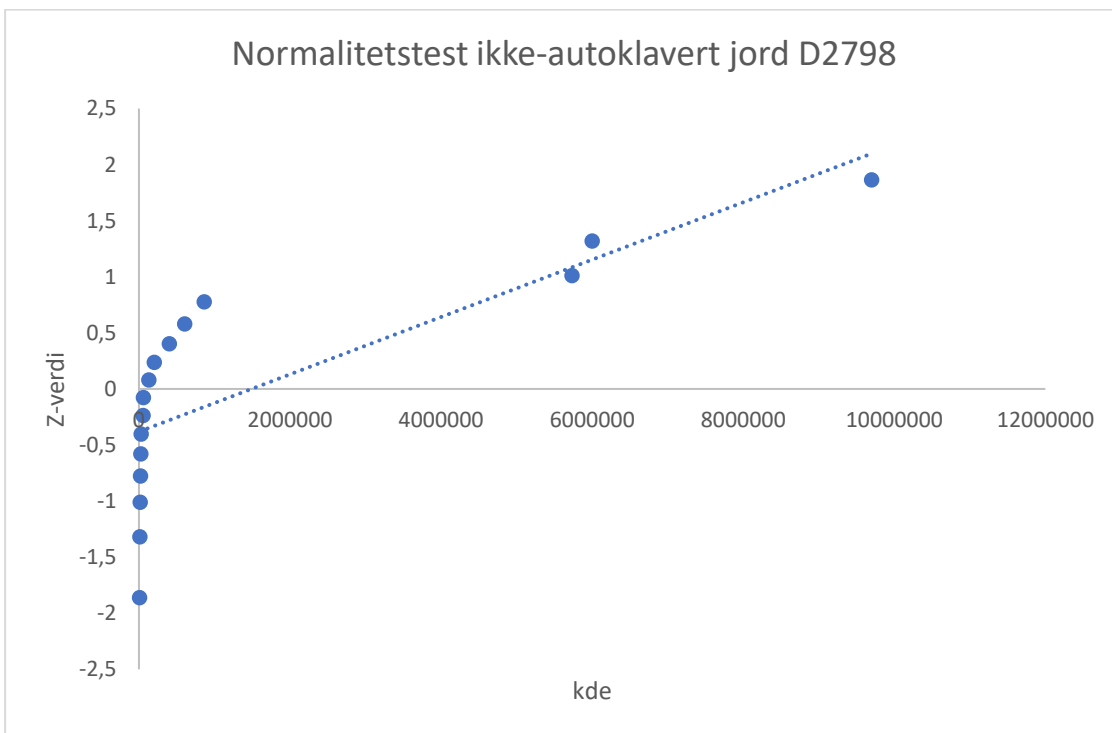
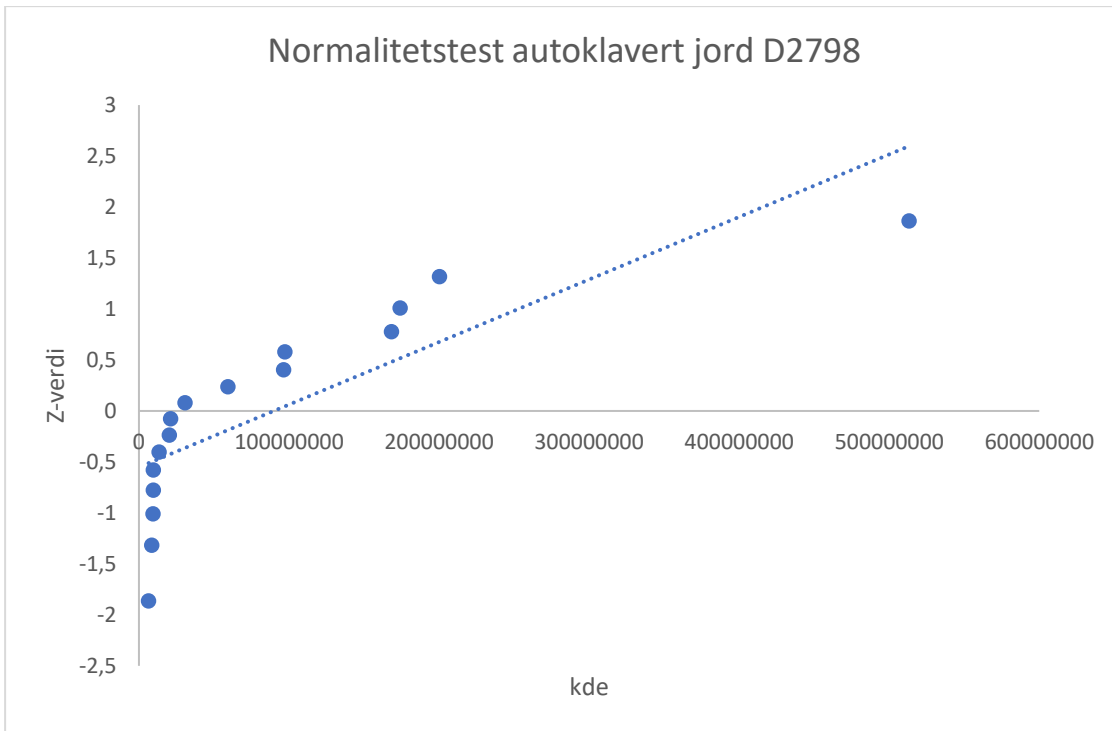
## Vedlegg 6. Normalitetstester











## Vedlegg 7. Gjennomsnitt og standardavvik, vann D1292

Gjennomsnittsverdier og standardavvik (SD) for alle uttakene gjennom forsøksperioden til persistensforsøk i vann for D1292.

D1292				
Dag	Autoklavert vann		Ikke-autoklavert vann	
	Gjennomsnitt	SD	Gjennomsnitt	SD
0	$2,0 \times 10^6$	$5,8 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	$4,5 \times 10^5$
1	$5,6 \times 10^6$	$1,7 \times 10^5$	$4,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^5$
2	$8,8 \times 10^6$	$6,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^6$	$1,9 \times 10^5$
3	$9,0 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$
8	$4,5 \times 10^6$	$4,1 \times 10^5$	$2,5 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$
9	$1,0 \times 10^7$	$7,8 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5$	$6,8 \times 10^4$
14	$7,1 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$6,5 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
16	$8,1 \times 10^6$	0*	$6,5 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$
21	$6,3 \times 10^6$	$8,3 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$	$7,4 \times 10^3$
23	$6,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$5,3 \times 10^3$
29	$6,4 \times 10^6$	$3,8 \times 10^5$	$7,9 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$
36	$6,0 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^3$	$7,8 \times 10^2$
43	$6,0 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$	$8,7 \times 10^2$	$2,9 \times 10^2$
50	$5,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$5,7 \times 10^2$	$3,4 \times 10^2$
57	$5,5 \times 10^6$	$9,7 \times 10^5$	$2,7 \times 10^2$	$9,4 \times 10^1$
64	$5,4 \times 10^6$	$3,3 \times 10^5$	$3,0 \times 10^2$	$4,5 \times 10^1$

\*Kun en måling, SD=0.

## Vedlegg 8. Gjennomsnitt og standardavvik, vann D2798

Gjennomsnittsverdier og standardavvik (SD) for alle uttakene gjennom forsøksperioden til persistensforsøk i vann for D2798.

D2798				
Dag	Autoklavert vann		Ikke-autoklavert vann	
	Gjennomsnitt	SD	Gjennomsnitt	SD
0	$3,7 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	$4,2 \times 10^6$	$4,6 \times 10^5$
1	$6,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$3,7 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$
2	$9,1 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$
3	$9,7 \times 10^6$	$3,6 \times 10^5$	$3,4 \times 10^6$	$1,8 \times 10^6$
8	$5,2 \times 10^6$	$7,8 \times 10^5$	$2,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
9	$8,1 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6$	$6,5 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4$
14	$6,4 \times 10^6$	$2,1 \times 10^5$	$3,7 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$
16	$5,5 \times 10^6$	$9,5 \times 10^5$	$4,7 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$
21	$5,9 \times 10^6$	$8,2 \times 10^5$	$5,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
23	$6,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	$4,8 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$
29	$6,5 \times 10^6$	$3,7 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
36	$4,7 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	$3,8 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$
43	$4,4 \times 10^6$	$4,9 \times 10^5$	$2,2 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$
50	$4,7 \times 10^6$	$7,5 \times 10^5$	$1,3 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$
57	$4,0 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6$	$1,0 \times 10^3$	$5,7 \times 10^2$
64	$4,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$3,8 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$

## Vedlegg 9. Gjennomsnitt og standardavvik, jord D1292

Gjennomsnittsverdier og standardavvik (SD) for alle uttakene gjennom forsøksperioden til persistensforsøk i jord for D1292. NA= manglende data.

D1292				
Dag	Autoklavert jord		Ikke-autoklavert jord	
	Gjennomsnitt	SD	Gjennomsnitt	SD
0	$5,2 \times 10^6$	NA	$4,0 \times 10^6$	$9,3 \times 10^5$
1	NA	NA	$3,7 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
2	$3,4 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	$6,1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$
3	$1,4 \times 10^7$	$3,0 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
6	$2,1 \times 10^7$	$3,4 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,0 \times 10^6$
8	$7,7 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$3,6 \times 10^5$	$7,8 \times 10^4$
10	$8,8 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6$	$3,9 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$
14	$1,1 \times 10^7$	$1,9 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$	$3,0 \times 10^4$
16	$1,1 \times 10^7$	$5,1 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$
21	$2,3 \times 10^7$	$6,2 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$
23	$2,0 \times 10^7$	$7,7 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	$7,3 \times 10^4$
29	$5,8 \times 10^7$	$3,6 \times 10^7$	$7,8 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4$
36	$1,4 \times 10^8$	$1,5 \times 10^7$	$5,8 \times 10^4$	$3,4 \times 10^4$
43	$1,4 \times 10^8$	$3,2 \times 10^7$	$3,6 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
50	$1,2 \times 10^8$	$3,1 \times 10^7$	$1,0 \times 10^4$	$4,0 \times 10^3$
57	$1,3 \times 10^8$	$8,3 \times 10^7$	$7,1 \times 10^3$	$8,7 \times 10^3$
64	$5,8 \times 10^7$	$5,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$	$2,0 \times 10^4$

## Vedlegg 10. Gjennomsnitt og standardavvik, jord D2798

Gjennomsnittsverdier og standardavvik (SD) for alle uttakene gjennom forsøksperioden til persistensforsøk i jord for D2798. NA=manglende data.

D2798				
Dag	Autoklavert jord		Ikke-autoklavert jord	
	Gjennomsnitt	SD	Gjennomsnitt	SD
0	$6,4 \times 10^6$	$9,0 \times 10^5$	$6,0 \times 10^6$	$5,1 \times 10^5$
1	NA	NA	NA	NA
2	$2,1 \times 10^7$	$4,0 \times 10^6$	$9,7 \times 10^6$	$3,0 \times 10^6$
3	$5,9 \times 10^7$	$1,6 \times 10^7$	$5,7 \times 10^6$	$1,2 \times 10^5$
6	$3,1 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$8,6 \times 10^5$	$8,3 \times 10^4$
8	$9,5 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6$	$6,1 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$
10	$9,5 \times 10^6$	$2,3 \times 10^6$	$4,0 \times 10^5$	$1,2 \times 10^5$
14	$9,6 \times 10^6$	$5,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4$
16	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^6$	$1,3 \times 10^5$	$6,3 \times 10^4$
21	$2,0 \times 10^7$	$5,3 \times 10^6$	$5,9 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$
23	$8,5 \times 10^6$	$3,0 \times 10^5$	$5,6 \times 10^4$	$1,0 \times 10^4$
29	$9,6 \times 10^7$	$1,7 \times 10^7$	$1,8 \times 10^4$	$5,8 \times 10^3$
36	$9,7 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$2,9 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
43	$1,7 \times 10^8$	$6,0 \times 10^6$	$1,1 \times 10^4$	$5,3 \times 10^3$
50	$1,7 \times 10^8$	$2,1 \times 10^7$	$2,6 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
57	$2,0 \times 10^8$	$1,7 \times 10^7$	$2,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
64	$5,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^8$	$9,2 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$

Vedlegg 11. Tabulerte verdier for Wilcoxon Signed-Ranks Test

n	alpha values						
	0.001	0.005	0.01	0.025	0.05	0.10	0.20
5	--	--	--	--	--	0	2
6	--	--	--	--	0	2	3
7	--	--	--	0	2	3	5
8	--	--	0	2	3	5	8
9	--	0	1	3	5	8	10
10	--	1	3	5	8	10	14
11	0	3	5	8	10	13	17
12	1	5	7	10	13	17	21
13	2	7	9	13	17	21	26
14	4	9	12	17	21	25	31
15	6	12	15	20	25	30	36
16	8	15	19	25	29	35	42
17	11	19	23	29	34	41	48
18	14	23	27	34	40	47	55
19	18	27	32	39	46	53	62
20	21	32	37	45	52	60	69
21	25	37	42	51	58	67	77
22	30	42	48	57	65	75	86
23	35	48	54	64	73	83	94
24	40	54	61	72	81	91	104
25	45	60	68	79	89	100	113
26	51	67	75	87	98	110	124
27	57	74	83	96	107	119	134

n	alpha values						
	0.001	0.005	0.01	0.025	0.05	0.10	0.20
28	64	82	91	105	116	130	145
29	71	90	100	114	126	140	157
30	78	98	109	124	137	151	169
31	86	107	118	134	147	163	181
32	94	116	128	144	159	175	194
33	102	126	138	155	170	187	207
34	111	136	148	167	182	200	221
35	120	146	159	178	195	213	235
36	130	157	171	191	208	227	250
37	140	168	182	203	221	241	265
38	150	180	194	216	235	256	281
39	161	192	207	230	249	271	297
40	172	204	220	244	264	286	313
41	183	217	233	258	279	302	330
42	195	230	247	273	294	319	348
43	207	244	261	288	310	336	365
44	220	258	276	303	327	353	384
45	233	272	291	319	343	371	402
46	246	287	307	336	361	389	422
47	260	302	322	353	378	407	441
48	274	318	339	370	396	426	462
49	289	334	355	388	415	446	482
50	304	350	373	406	434	466	503

Hentet fra: [Wilcoxon Signed-Ranks Table | Real Statistics Using Excel \(real-statistics.com\)](http://real-statistics.com)





**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway