

Kartlegging av antibiotikaresistente bakteriar i marine skjel

– *Antibiotikaresistens i akvatisk miljø*

Cecilie Smith Svanevik, Didrik Hjertaker Grevskott, Lena Skår Bernssen, Bjørn Tore Lunestad og Monica Sanden



Prosjektrapport

Rapport: Nr. – År: Dato:
RAPPORT FRA HAVFORSKNINGEN 10-2018 30.01.2018

Tittel (norsk og engelsk):
Kartlegging av antibiotikaresistente bakteriar i marine skjel
Screening for antimicrobial resistant bacteria in marine bivalves

Forfattere:
Cecilie Smith Svanevik, Didrik Hjertaker Grevskott, Lena Skår Bernssen,
Bjørn Tore Lunestad og Monica Sanden

Distribusjon: Open

Havforskningsprosjektnr.:
15290

Oppdragsgiver(e):
Miljødirektoratet

Oppdragsgivers referanse:
17080031
M-965|2018

Program:
Trygg og sunn sjømat

Forskningsgruppe:
Fremmed- og smittestoff

Antall sider totalt:
36

Samandrag (norsk):

På oppdrag for Miljødirektoratet, har HI undersøkt førekomst av antibiotikaresistente bakteriar i marine skjel samla inn langs Norskekysten i perioden frå juni til august 2017. Det vart undersøkt 26 parti med skjel frå i alt 18 lokalitetar med ulik grad av menneskeleg innverknad. Totalt 252 bakterieisolat frå desse prøvane vart undersøkte for fenotypisk antibiotikaresistens, samt resistens mot eit utval tungmetall med kjende resistensdrivande eigenskapar (koppar, sink og kadmium). Bakterieisolata som vart dyrka fram utan antibiotika tilsett i vekstmediet og seinare undersøkt for resistens, gav innsyn i den generelle førekomsten av resistenseigenskapar både hos bakteriar som høyrer heime i havet og hos bakteriar tilført frå andre kjelder. Det vart og dyrka fram bakterieisolat med medier tilsett antibiotika for å fremje vekst av antibiotikaresistente bakteriar og for å betre kunne undersøkje koplinga mellom antibiotikaresistens og tungmetallresistens. Undersøkingane viste at

- 65 % av isolata dyrka fram utan antibiotika (n=75) var resistente mot færre enn tre antibiotika, medan 33 % vart klassifisert som multiresistente (MR).
- Mange av isolata som vart definerte som MR (33 %) var resistente som fylje av naturleg ibuande resistens for den aktuelle arten, og kan ikkje reknast som tilført antibiotikaresistens.
- Hyppigast førekomst (>40 %) var resistent mot cefotaxim, ampicillin, amoxicillin, mecillinam og ceftazidim.
- Det vart ikkje funne resistens mot nalidiksinsyre, eller nokre av dei klinisk relevante stoffa doxysyklin, tetrasyklin, meropenem, levofloxacin, eller ciprofloxacin.
- Bakterieisolata var dominerte av artar ein finn i mange miljø, som *Pseudomonas* sp. og *Stenotrophomonas* sp., og som er kjende for å ha ibuande resistenseigenskapar mot fleire antibiotika. Det vart likevel påvist resistens hos nokre av desse som dei vanlegvis er sensitive for, som til dømes ceftazidim og tobramycin.
- Det vart ikkje funne auka førekomst av resistente bakteriar frå lokaliteten med høg menneskeleg innverknad.
- Dei lokalitetane der meir enn 50 % av isolata var MR var klassifisert som både låg og medium menneskeleg innverknad, og alle hadde høgare nivå av *E. coli*.
- Samanhengsanalysar viste signifikant kopling mellom koppar- og sinkresistens og MR, mellom kopparresistens og resistens mot vancomycin, sinkresistens og resistens mot imipenem, samt kadmiumresistens og resistens mot doxysyklin.
- Ved framtidig overvaking av antibiotikaresistens og tungmetallresistens i marint miljø, bør andre bakteriar i tillegg til *Escherichia coli* nyttast som indikatororganisme då berre 0,01 % av det generelle bakterietallet i skjela var *E. coli*.

Summary (English):

On assignment from The Environmental Agency, The Institute of Marine Research (IMR/HI) has performed screening for antibiotic resistant bacteria in marine bivalves collected along the Norwegian coast in June, July and August 2017. Totally, 26 sample batches of bivalves originating from 18 different locations with different degree of anthropogenic influence. Totally 252 bacterial isolates were obtained from these samples and examined for phenotypic antimicrobial resistance (AMR), as well as resistance towards selected heavy metals identified as potential antimicrobial resistance drivers (copper, zinc and cadmium). Knowledge about the general prevalence of antimicrobial resistance were obtained by resistance testing on isolates obtained after cultivation on general growth media without any selection, including indigenous marine bacteria and bacteria originating from other sources. To increase the data set when examining the

relation between antimicrobial resistance and resistance towards heavy metals, bacterial isolates were also obtained after cultivation on growth media added antibiotics.

- Totally 65 % of the bacterial isolates obtained without antibiotic selection (n=75), were resistant to less than three antibiotics, whereas 33 % were classified as multi-resistant (MR).
- Several of the MR isolates were intrinsically resistant, and had not necessarily acquired any AMR genes.
- Resistance were most frequently (>40%) seen for cefotaxime, ampicillin, amoxicillin, mecillinam and ceftazidime.
- There were no observed resistance against nalidixic acid, and some clinical relevant compounds such as doxycycline, tetracycline, meropenem, levofloxacin and ciprofloxacin.
- The identified isolates were dominated by bacterial species found in many environments, such as *Pseudomonas* sp. and *Stenotrophomonas* sp. These bacteria are known to be intrinsically resistant towards several antibiotics. Still, some isolates were resistant against antibiotics that they usually are sensitive for, such as ceftazidime and tobramycin.
- There was no observed increase in resistance in bacteria from the location defined with high anthropogenic influence.
- Locations where more than 50 % of the isolates were MR were found at locations with both low and medium anthropogenic influence, and commonly all had higher levels of *E. coli*.
- Correlations were found between MR in bacterial isolates and resistance against copper and/or zinc, as well as copper resistance and resistance against vancomycin, zinc resistance and resistance towards imipenem, and resistance to cadmium and doxycycline.
- In future research on antibiotic- and heavy metal resistance in the marine environment, the inclusion of other bacterial species than *Escherichia coli*, would be useful, as this bacterium only comprised 0.01 % of the total cultivable bacteria.

Emneord (norsk):

1. Antibiotikaresistens
2. Tungmetallresistens
3. Marine skjel
4. Marint miljø

Subject heading (English):

1. Antibiotic resistance
2. Heavy metal resistance
3. Marine bivalves
4. Marine environment

Cecilie Svanevik

prosjektleder

Monica Sanden

faggrupeleder



Innhald

1	Forord	5
2	Innleiing	6
3	Materiale og metodar	7
	3.1 Lokalitetar og prøveinnsamling.....	7
	3.2 Mikrobiologiske undersøkingar.....	9
	3.2.1 Prøveopparbeing	9
	3.2.2 Kvantitativ analyse.....	9
	3.2.3 Kvalitativ antibiotika-selektert påvising av bakteriar	10
	3.2.4 Bakteriekultursamling	10
	3.2.5 Fenotypisk antibiotikaresistenstesting	10
	3.2.6 Fenotypisk metallresistenstesting.....	11
	3.2.7 Identifisering	11
	3.3 Tungmetallanalysar.....	11
	3.4 Mikrobank og biobank	11
	3.5 Grafar og statistikk	12
4	Resultat.....	13
	4.1 Kvantitative og kvalitative mikrobiologiske analysar av skjel.....	13
	4.1.1 Bakterietalet i skjel.....	13
	4.1.2 Kvalitativ antibiotika-selektert påvising av bakteriar	13
	4.2 Bakteriesamling.....	14
	4.3 Fenotypisk resistens mot antibiotika og tungmetall.....	14
	4.3.1 Bakterieisolat dyrka fram utan antibiotika.....	14
	4.3.2 Bakterieisolat dyrka fram med antibiotika.....	15
	4.4 Samanheng mellom resistens mot tungmetall og antibiotika	17
	4.4.1 Samanheng mellom tungmetallresistens og antibiotikaresistens/multiresistens....	17
	4.4.2 Samanheng mellom tungmetallresistens og resistens mot enkelte antibiotikum...	17
	4.5 Identifiserte bakterieisolat.....	18
	4.6 Tungmetall i skjel	19
5	Diskusjon.....	20
6	Konklusjonar	24
7	Anbefalingar for vidare arbeid.....	25
8	Tabellar og vedlegg.....	26
9	Kjelder.....	34

1 Forord

Denne rapporten er skrevet på oppdrag for Miljødirektoratet og er utført i perioden juni 2017 til februar 2018. Oppdraget var å kartlegge forekomst av antibiotikaresistens i akvatisk miljø, og det vart nytta marine skjel som prøvemateriale for dette. Rapporten baserer seg på prøvar innhenta gjennom Mattilsynets tilsynsprogram for skjel, og NIFES har innhenta løyve frå dei til å nytte desse prøvene for dette formålet. Frå 1. januar 2018 vart NIFES fusjonert med Havforskningsinstituttet og fekk Havforskningsinstituttet som nytt felles namn. Oppdragstakar er referert til som HI vidare i rapporten, sjølv om instituttets namn var NIFES under storparten av oppdragsperioden.

Teknisk ansvarleg for arbeidet har vore Betty Irgens, medan Manfred Torsvik stod for prøveregistering, veking av skjel og prøveopparbeiging til tungmetallanalysar, samt merking og fordeling av prøvane til laboratoria. Mikrobiologiske analysar vart gjort ved laboratorium for molekylærbiologi der Betty Irgens, Didrik Hjertaker Grevsjøtt og Lena Skår Bernssen har utført dyrking av bakteriane, antibiotikaresistenstesting, og artsidentifisering. Betty Irgens, Tone Galluzzi og Cecilie Smith Svanevik har utført metallresistensanalysane. Analysar av tungmetall vart utført ved laboratorium for grunnstoff av Snorri Gunnarsson.

Me ynskjer å takke alle som har delteke i gjennomføringa av prosjektet.

HI, februar 2018

2 Innleiing

Antibiotikaresistente bakteriar er ei av dei største helse relaterte utfordringane på verdsbasis. Auka førekomst av resistens kan medføre behandlingssvikt for infeksjonar som tidlegare har latt seg behandle. Bakteriar finn ein naturleg i alle miljø, og mange av eigenskapane som gjer dei motstandsdyktige mot antibiotika er og naturleg førekomande, men menneskeleg innverknad vil kunne auke førekomsten og fremje bakteriar med nye resistenseigenskapar. Mange av dei antibakterielle stoffa som vert brukt av menneske eller til husdyr, vert skilde ut i aktiv form gjennom urin eller avføring. Kloakkrensing vil berre i liten grad fjerne desse stoffa før dei havnar i havet. Sjølv om slike restar av antibiotika vil verta tynna ut til konsentrasjonar som ikkje direkte påverkar veksten av bakteriar, kan dei likevel påverke utviklinga av resistens [1, 2]. I tillegg vil behandling med antibiotika kunne føre til utvikling av resistens hos andre bakteriar enn dei behandlinga er retta mot. Dette kallar ein gjerne for stoffa sin økoskygge. Antibiotika som er breispektra verkar mot ei rekkje bakteriegrupper og har større økoskygge, då dei har større innverknad på miljøbakteriar enn stoff som er smalspektra. Kloakk, avrenning frå land, samt avføring frå ville dyr og fuglar, vil føre til at antibiotika med stor økoskygge og bakteriar med og utan resistens endar opp saman i det marine miljø. I miljøet kan ein få antibiotika-driven utvikling av resistens hos marine bakteriar, eller ein kan få opphoping av resistente bakteriar frå landkjelder inn i den marine næringskjeda. I tillegg har fleire andre kjemiske stoff som endar opp i havet vist å ha resistensdrivande eigenskapar. Vitenskapskomiteen for mattryggleik (VKM) peikar på at tungmetall som kobbar, sink og kadmium, har innverknad på den generelle utviklinga av antibiotikaresistens [3, 4].

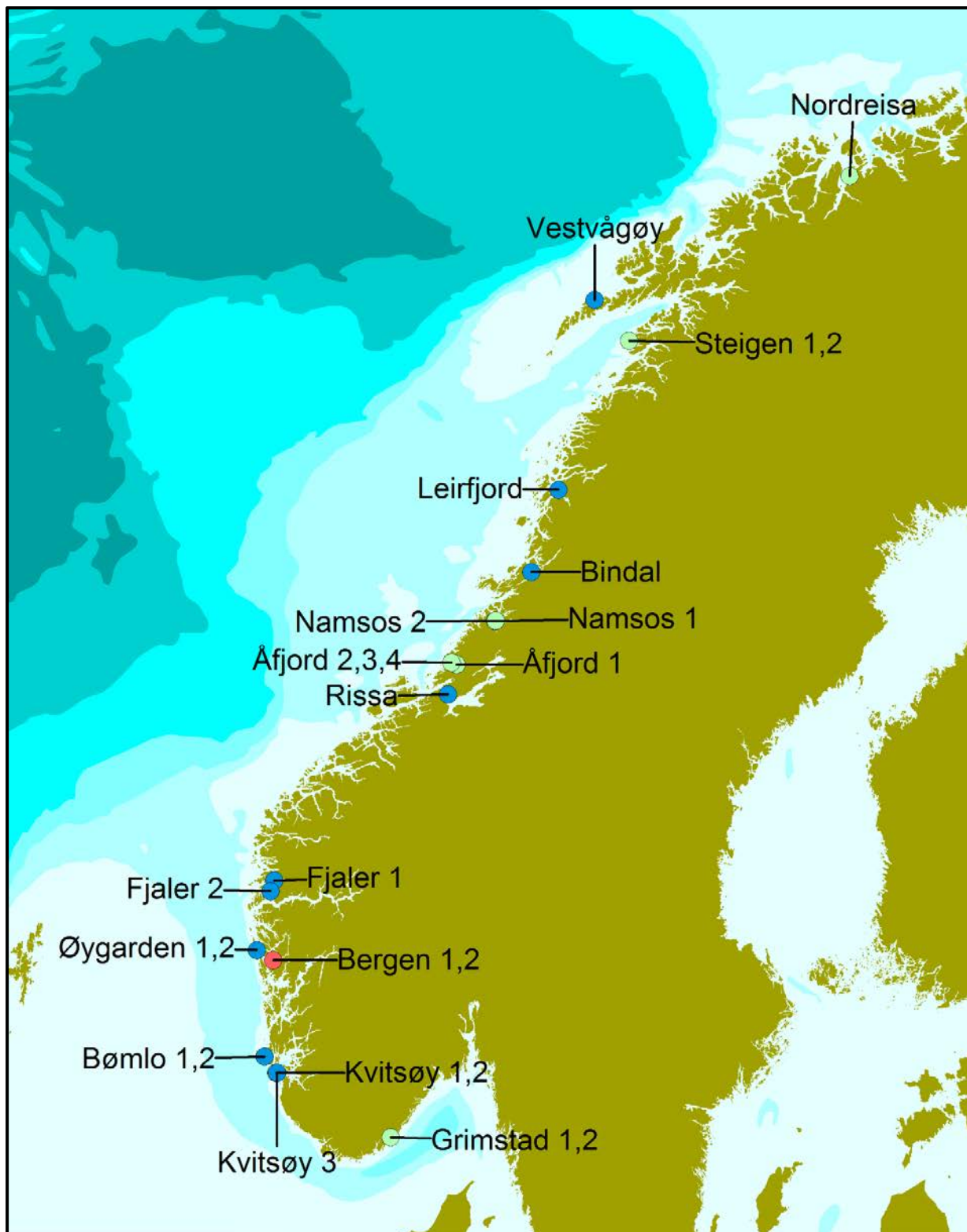
Marine skjel, som blåskjel (*Mytilus edulis*), er gjerne det første leddet som kan fange opp resistente bakteriar i havet. Skjel er stasjonære og filtrerar frittlevande partiklar som algar, detrius og mikroorganismar, inkludert antibiotikaresistente bakteriar som måtte vera til stades. Dei fungerer difor som ein biologisk samlestasjon i vatnet og vil uttrykkje den samla bakteriebelastninga i eit bestemt området, uavhengig av kva som er den opphavslege bakteriekjelda. Skjel kan difor nyttast som indikatororganisme for både mikrobiologiske og kjemiske parametar, og er vorte føreslått som ein god indikatororganisme for antibiotikaresistente bakteriar [5].

På oppdrag for Mattilsynet overvakar HI kontinuerleg norske skjel for fekale indikatorbakteriar (*Escherichia coli*), samt kjemiske framandstoff. Prøvematerialet består av parti med skjel som er samla inn frå lokalitetar langs Norskekysten, og innsamling føregår gjennom heile året. Det er desse skjelprøvane som er nytta i vår kartlegging av antibiotikaresistente bakteriar i marint miljø.

3 Materiale og metodar

3.1 Lokaltetar og prøveinnsamling

Etter å ha innhenta løyve frå Mattilsynet, har HI utført kartlegging av antibiotikaresistente bakteriar i det akvatiske miljøet ved å nytte marine skjel frå deira tilsynsprogram. Mattilsynet er ansvarleg for val av lokalitetar, hausting og innsending av prøvane til HI. Sommarmånadane vert rekna som høgsesong for sjølvplukking av blåskjel, og Mattilsynet sender då inn prøvar frå fleire lokalitetar enn resten av året. Ved HI har ein isolert resistente bakteriar frå skjel som vart innsendt i juni, juli og august, vekene 24 til 35, 2017. Mattilsynet sine lokalitetar er knytt til områder som, i alle høve periodevis, let seg utnytte for hausting til konsum. Som kontrollstasjon har HI i same tidsperiode samla inn skjelprøvar frå Byfjorden i Bergen, som representerer ein lokalitet med kjend høg menneskeleg innverknad [6]. Totalt vart 18 lokalitetar langs Norskekysten frå Aust-Agder til Troms undersøkt (Figur 1), og lokalitetane vart klassifisert etter låg, medium og høg menneskeleg innverknad basert på fire faktorar; relevante varslingar på Miljødirektoratet si kartteneste [7], innbyggjartal per kommuneareal [8], innbyggjartal per kommunalt kystareal [9] og førekomst av *E. coli* i skjelprøven frå lokaliteten (Figur 11). Kystareal er tatt med på bakgrunn av at mykje av den menneskelege innverknaden frå ulike kjelder av forureining, inklusiv kloakk og kystnær industri, vil ende opp i kringliggjande kystområde (Sjå kap.8, Tabell 3 for utrekning). Totalt 26 parti med skjel vart undersøkt og utgjorde sju ulike skjelartar, av desse var 18 parti blåskjel (*Mytilus edulis*), 2 parti kamskjel (*Pecten maxiums*), 2 parti flatøsters (*Oestra edulis*), samt 1 parti kvar av stillehavsøsters (*Crassostrea gigas*), sandskjel (*Mya aranara*), hjarteskjel (*Cerastoderma edule*) og kuskjel (*Arctica islandica*). Skjelart, kommune og utrekna menneskeleg innverknad er vist i Tabell 1.



Figur 1: Kart over lokalitetar, namngiven etter kommune, med skjelparti undersøkt for antibiotikaresistente bakteriar. Lokalitetar med tal indikerar at fleire skjelparti vart undersøkt frå same lokalitet (sjå Tabell 1). Lokalitetane er gitt farge ut frå grad av menneskeleg innverknad; grøn=låg, blå=medium og raud=høg (sjå Tabell 3).

Tabell 1: Oversikt over undersøkte lokalitetar (kommune), grad av menneskeleg innverknad (sjå Tabell 3), marine skjelartar (prøvar) og om skjela var frå villbestand eller oppdrett.

Kommune	Menneskeleg innverknad	Artar	Oppdrett/villbestand
Grimstad 1	Låg	Stillehavsøsters	Villbestand
Grimstad 2	Låg	Blåskjel	Oppdrett
Kvitsøy 1	Låg	Flatøsters	Oppdrett
Kvitsøy 2	Låg	Blåskjel	Oppdrett
Kvitsøy 3	Medium	Kamskjel	Oppdrett
Bømlo 1	Medium	Flatøsters	Oppdrett
Bømlo 2	Medium	Blåskjel	Oppdrett
Bergen 1	Høg	Blåskjel	Villbestand
Bergen 2	Høg	Blåskjel	Villbestand
Øygarden 1	Medium	Kamskjel	Villbestand
Øygarden 2	Medium	Blåskjel	Villbestand
Fjaler 1	Medium	Blåskjel	Oppdrett
Fjaler 2	Medium	Blåskjel	Oppdrett
Rissa	Medium	Blåskjel	Oppdrett
Åfjord 1	Låg	Blåskjel	Oppdrett
Åfjord 2	Låg	Blåskjel	Villbestand
Åfjord 3	Låg	Hjarteskjel	Villbestand
Åfjord 4	Låg	Sandskjel	Villbestand
Namsos 1	Låg	Blåskjel	Oppdrett
Namsos 2	Låg	Blåskjel	Oppdrett
Bindal	Medium	Blåskjel	Oppdrett
Leirfjord	Medium	Blåskjel	Oppdrett
Steigen 1	Låg	Kuskjel	Villbestand
Steigen 2	Låg	Blåskjel	Villbestand
Vestvågøy	Medium	Blåskjel	Oppdrett
Nordreisa	Låg	Blåskjel	Oppdrett

3.2 Mikrobiologiske undersøkingar

3.2.1 Prøveopparbeing

Grunna krav til minste mengd prøvemateriale i gjeldande EU-metodikk, vart det frå kvart parti undersøkt samleprøvar av 10 til 25 skjel. Skjela vart vaska før opning med steril kniv. Totalt 50 gram innmat og kappevatn vart veid inn og fortynna 1:10 med 450 ml fortynningsvatn og homogenisert. Dette homogenatet vart nytta vidare i dei ulike mikrobiologiske oppsetta.

3.2.2 Kvantitativ analyse

Det generelle bakterietalet i skjelprøvane vart bestemt ved dyrking av skjelsuspensjon i 10x fortynningar. Frå røyr med fortynna prøve vart 0,1 ml stoken ut på skåler med Mueller Hinton (MH) agar utan tilsett antibiotika, og talet på framveksande koloniar vart registrert som kolonidannande einingar (KDE) per gram skjelmateriale. Nedre og øvre deteksjonsgrense var på høvesvis <100 og >2,5x10¹⁰ KDE/g. Skåler med MH agar tilsett ulike antibiotika vart nytta for kvantifisering av bakterietalet med observert antibiotikaresistens, og antibiotika vart valde med bakgrunn i WHO si liste over kritisk viktige antibiotika i humanmedisin [10], som 3 gen. cefalosporinar og kinolonar, oversikta over dei mest forskreve antibiotika i Noreg [11], som penicillinar, samt klinisk viktig antibiotika ein har

funne resistens mot i sjømat, som karbapenemar [12]. Frå 10x fortynning vart 0,1 ml stoken ut på MH skålene tilsett anten 50 mg/L ampicillin (AMP), 2 mg/L ceftazidim (CAZ), 0,06 mg/L ciprofloxacina (CIP) eller 10 mg/L imipenem (IPM). For å sikre vekst av både marine miljøbakteriar og tilførte bakteriar vart alle skålene inkubert ved 25 °C i 72±6 timer. Deteksjonsgrensa var mellom <100 og 2,5x10⁴ KDE/g.

For å kunne gje eit meir riktig tal for mengde resistente isolat, vart bakterietalet får skåler tilsett AB justert med ein prosentfaktor. Denne prosentfaktoren var bestemt ut i frå andelen av isolata frå dei enkelte skålene som etter antibiotikaresistenstestinga viste seg å faktisk vere resistent mot det enkelte antibiotikumet i skålene, til dømes bakterieisolat frå skåler tilsett AMP som faktisk var resistent mot AMP. Fylgjande formel vart brukt: $KDE/g \text{ på } AB_x \times (\% \text{ isolat frå } AB_x \text{ skål med resistens mot } AB_x / 100)$.

HI undersøker også, på oppdrag for Mattilsynet, talet på *E. coli* i skjel ved hjelp av ein «Most Probable Number», MPN-metodikk med dyrking og påvising i buljong og på skål der deteksjonsgrensa er <18 MPN *E. coli*/100 g prøve [13]. Resultata frå dei undersøkte skjelpartia er tatt med her då dei vart inkluderte i utrekninga av menneskeleg innverknad på lokalitetane.

3.2.3 Kvalitativ antibiotika-selektert påvising av bakteriar

For å selektere fram bakteriar med resistens mot eit utval antibiotika, vart 1 ml av skjelsuspensjonen tilsett i røyr med Nutrient-buljong og antibiotika, med same konsentrasjonar som for skålene i kvantitativ analyse. Buljongen vart tilsett anten 50 mg/L ampicillin (AMP), 2 mg/L ceftazidim (CAZ), 0,06 mg/L ciprofloxacina (CIP) eller 10 mg/L imipenem (IPM). Røyra vart inkubert ved 25 °C i 48±4 timer. Antatt bakterievekst i røyra vart bekrefta ved utplating av 0,1 ml på MH-skåler tilsett same antibiotika. Berre røyr med vekst og som samtidig hadde vekst på skål vart registrert som påvist/ikkje påvist og skulle gje svar på om det er bakteriar i skjelp prøven med resistens mot dei valde antibiotika. Kontrollstammer for dei ulike antibiotika og mædiane er vist i Tabell 8.

3.2.4 Bakteriekultursamling

Frå kvart parti med skjel vart det plukka ut ca. 20 isolat for resistenstesting. Dette utgjorde 10 isolat frå ikkje-selektive skåler, og 10 isolat (dersom det var så mange) frå selektive skåler tilsett antibiotika (både frå kvalitative og kvantitative skåler). Isolata vart dyrka til reinkultur ved gjenteken overføring til MH-skåler utan tilsett antibiotika. Vidare vart isolata klassifisert etter Gram-testing (positiv/negativ), samt etter produksjon av katalase- eller oksidase-enzym.

3.2.5 Fenotypisk antibiotikaresistenstesting

Kvart bakterieisolat vart testa for fenotypisk antibiotikaresistens ved hjelp av hemmingssonetest og lappar med antibiotika i fleire ulike klassar, mange med høg relevans i human- og veterinærmedisin. To panel med 18 antibiotika vart sett opp for Gram-negative og Gram-positive bakterieisolat (Tabell 2). Metoden for resistenstesting vart utført etter standardisert protokoll frå EUCAST [14], unntatt ved testing av isolat som ikkje lèt seg dyrke ved 35 °C. Desse vart satt opp med same metodikk, men inkubert ved 25 °C. Hemmingssonar vart målt som diameter (mm) og EUCAST protokollen vart og nytta til å definere brytingspunktet for resistens for bakteriegruppene som er inkludert der, som til dømes Enterobacteriaceae. For bakterieisolat som ikkje er dekkja i EUCAST, vart berre fullstending fråvær av sone (0 mm) rekna som resistens. Samanstillinga av datasettet vart delt i to grupper ut i frå om bakterieisolata var dyrka fram utan eller med antibiotika. Isolat som var resistent mot tre eller fleire antibiotika i tre ulike klassar vart klassifisert som «multiresistente» (MR) [15].

Tabell 2: Oversikt over klassar av antibiotika og konsentrasjonar av enkeltstoff (μg) nytta i resistenstesting ved hjelp av hemmingssone lappetest, samt oppsett (X) for Gram-negative og Gram-positive bakterier.

Antibiotikaklasser	Forkorting	Antibiotikum	Gram negative	Gram positive
Penicillinar med utvida spekter	AMP	ampicillin (10 μg)	X	X
	AML	amoxicillin (10 μg)	X	X
	MEL	mecillinam (10 μg)	X	X
Kinolonar og fluorokinolonar	CIP	ciprofloxacin (5 μg)	X	X
	NA	nalidiksinsyre (30 μg)	X	
	LEV	levofloxacin (5 μg)		X
3. gen. Cefalosporinar	CAZ	ceftazidim (10 μg)	X	X
	CTX	cefotaxim (5 μg)	X	X
Folsyrehemmare (sulfonamidar og trimetoprim)	W	trimetoprim (5 μg)	X	X
	SXT	trim./sulfametoksazol (1.25/23.75 μg)	X	X
Karbapenemar	IPM	imipenem (10 μg)	X	X
	MEM	meropenem (10 μg)	X	X
Tetrasyklinar	DO	doxysykin (30 μg)	X	X
	TE	tetrasykin (30 μg)	X	
Aminoglykosidar	CN	gentamicin (10 μg)	X	X
	K	kanamycin (30 μg)	X	X
	TOB	tobramycin (10 μg)	X	
Nitrofurandar	F	nitrofurantoin (100 μg)	X	X
Amfenikolar	C	kloramfenikol (30 μg)	X	X
Makrolidar	E	erytromycin (15 μg)		X
Glykopeptidar	VA	vancomycin (5 μg)		X

3.2.6 Fenotypisk metallresistenstesting

Resistens mot koppar, sink og kadmium vart undersøkt ved utplating på MH-agar med aukande tungmetallkonsentrasjon (0,095 mM, 0,188 mM, 0,375 mM, 0,75 mM, 1,5 mM, 3,0 mM, 6,0 mM og 12,0 mM). Lågaste konsentrasjon som heilt hemma vekst av bakterieisolatet vart rekna som minste hemmande konsentrasjon (MIC). For samanlikning med antibiotikaresistensprofilane vart brytingspunktet for tungmetallresistens definert ut frå aktuell litteratur og satt til 3,0 mM for koppar og sink, og 1,5 mM for kadmium [16]. Metallkonsentrasjonane i agarplatene vart verifisert for utvalde parallellar ved hjelp plasmamassespektrometer (ICP-MS) (Tabell 9).

3.2.7 Identifisering

Eit utval av bakterieisolat med særleg interessante resistensprofilar frå dei ulike lokalitetane vart identifisert ved 16S rRNA genet i BLAST etter Sanger-sekvensering med Big Dye protokoll etter etablert metodikk på HI [17] og SeqLab ved Universitetet i Bergen.

3.3 Tungmetallanalysar

Prøveopparbeiding for analyser for tungmetall vart utført på same måte som avtalt med Mattilsynet [13]. Kvart skjel vart målt og veid, og snittlengda, vekt av heile skjel, skalvekt, samt våtvekt (v.v) av dei blaute delane vart bestemt. Samleprøvar frå innmaten til 25 skjel vart frysetørka og finmalt til pulver før berekninga av tørrstoffinnhald. Tungmetallbestemming ved hjelp av ICP-MS vart utført på to parallellar frå kvar prøve. HI har akkreditert metode for koppar, sink og kadmium.

3.4 Mikrobank og biobank

Alle bakterieisolata er lagra på mikrobankrøyr som inneheld konserveringsvæske og fryst ved $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for framtidige analyser. Nokre av isolata overlevde ikkje denne forma for lagring og må sjåast på som

tapt. For skjelmaterialet nytta for tungmetallanalyser vart det i tillegg laga Biobank av overskytande prøvemateriale, lagra ved $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dette kan nyttast til framtidige analyser for andre resistensdrivande stoff.

3.5 Grafar og statistikk

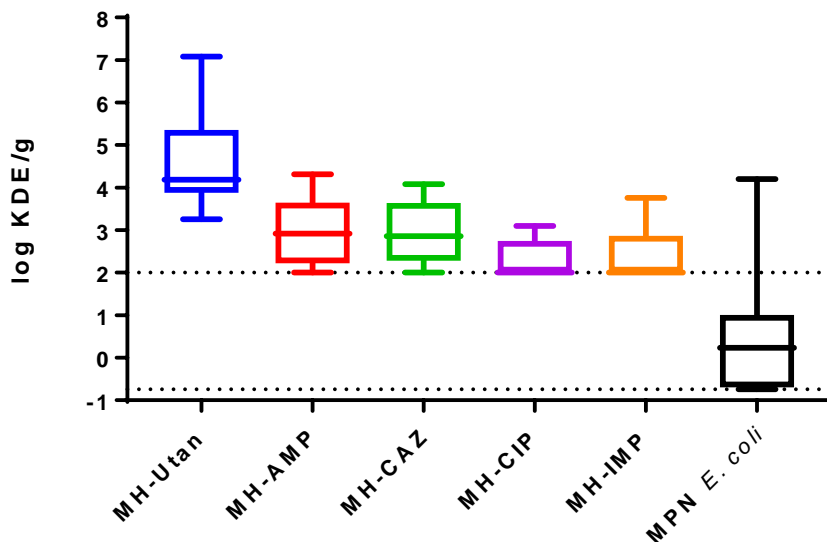
GraphPad Prism 7.02 vart nytta til å laga grafar, samt køyre statistikk. Samanhengsanalysar vart utført ved bruk av kontingenstabellar med Chi-square test for 2×2 matriser, utrekning av Odds ratio (OR) etter Baptista-Pike metode og p-verdi etter Fisher's exact test. Positiv samanheng er sett dersom $OR > 1$, samt $p < 0,05$. Då kontingenstabellar ikkje kan utføre OR for teljingar lik 0, vart det satt inn 1 i matrisen i staden og OR rapportert som $>$ verdien utrekna for 1.

4 Resultat

4.1 Kvantitative og kvalitative mikrobiologiske analysar av skjel

4.1.1 Bakterietalet i skjel

For kvantitative analysar vart det dyrka bakteriar frå skjel på ikkje-selektiv MH-agar, og på MH-agar tilsett anten ampicillin, ceftazidim, ciprofloxacin eller imipenem. Det generelle bakterietalet varierte frå $1,8 \times 10^3$ til $1,2 \times 10^7$ KDE/g, med median på $1,5 \times 10^4$ KDE/g (Figur 2). For å gje meir riktig bakterietal frå MH-agar tilsett antibiotika vart bakterietala justert med ein prosentfaktor som forklart i avsnitt 3.2.2. var høvesvis 5,4 % og 4,7 % for ampicillin og ceftazidim av det totale bakterietalet, medan medianen for ciprofloxacin og imipenem låg ved deteksjonsgrensa på 100 KDE/g. Medianen for *E. coli* var 0,01 % av medianen til MH utan. Samanheng ($p < 0,05$) i førekomst i bakterietal vart sett mellom aukande bakterietal i MH-utan, og aukande bakterietal for MH-AMP og MH-IPM. Det var ikkje sett noko samanheng mellom generelt bakterietal og talet på *E. coli*. Sjå kap. 8 for figur med ikkje-faktorjusterte bakterietal (Figur 10) og utvida figur med bakterietal frå ulike medier fordelt på lokalitetar (Figur 11).



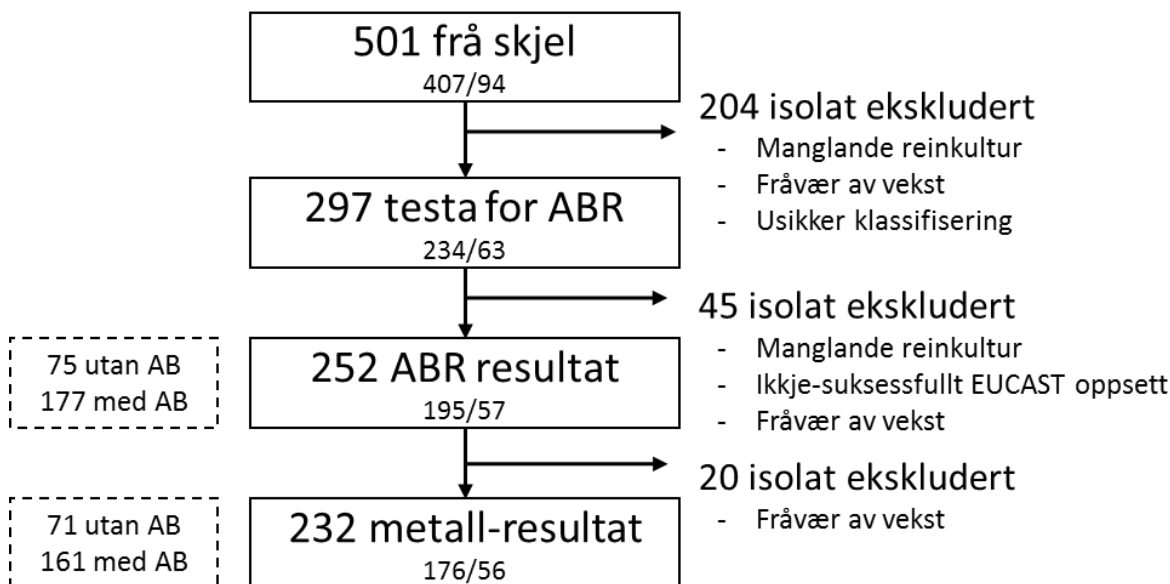
Figur 2: Medianverdi ($n=26$) med spekter for bakterietal (log KDE/g) frå MH-agar utan antibiotika, MH med 50 mg/L ampicillin (AMP), MH med 2 mg/L ceftazidim (CAZ), MH med 0,06 mg/L ciprofloxacin (CIP), MH med 10 mg/L imipenem (IPM) og MPN/g *E. coli*. Stipla line indikerar deteksjonsgrensa < 100 KDE/g (2 log). MPN *E. coli* har deteksjonsgrensa $< 18/100$ g (-0,74 log).

4.1.2 Kvalitativ antibiotika-selektert påvising av bakteriar

Det vart påvist vekst i alle MH-rør tilsett ulike antibiotika i 17 av 26 prøvar. Talet på rør med påvist vekst var 24 av 26 for ampicillin, 25 av 26 for ceftazidim, 24 av 26 for ciprofloxacin og 18 av 26 for imipenem. Lågast andel påvising var i kamskjel frå Ulvøysundet, der det berre vart påvist vekst i rør med ciprofloxacin. Det er godt samsvar mellom fråverande vekst i MH-rør og låge bakterietal på MH-skåler tilsett tilsvarende antibiotika. Eit unntak er eit parti blåskjel der det ikkje var vekst i rør med ciprofloxacin, medan bakterietalet på skåler med ciprofloxacin var relativt høgt (6000 KDE/g).

4.2 Bakteriesamling

Ved ferdigstilling av bakteriesamlinga var det samla inn 501 bakterieisolat for vidare karaterisering. Grunna kvalitetskrav for reinkultur, samt at ein del isolat ikkje l t seg dyrke etter lagring på Mikrobank, vart 252 isolat inkludert for antibiotikaresistenstesting og 232 isolat for tungmetallresistenstesting (Figur 3).



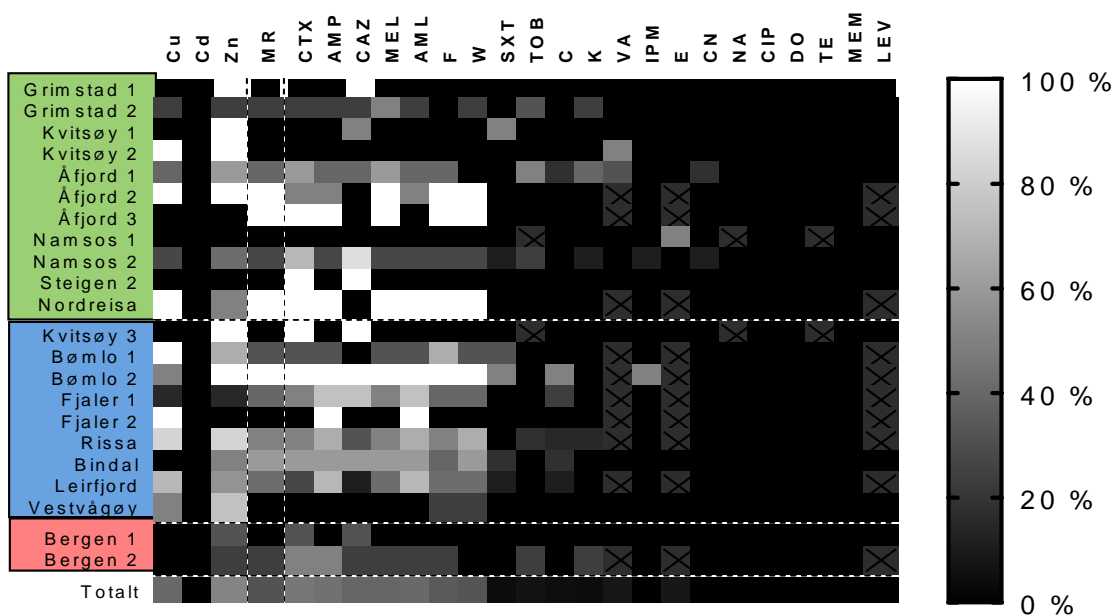
Figur 3: Oversikt over talet på inkluderte isolat, og årsak for ekskludering som manglande reinkultur, fr v er av vekst etter lagring, usikker klassifisering eller mangelfulle resultat, fram til ferdigstilt datasett, samt tal på Gram-negative/Gram-positive isolat. Stipla boksar visar fordeling mellom talet på isolat dyrka fram med og utan antibiotika.

4.3 Fenotypisk resistens mot antibiotika og tungmetall

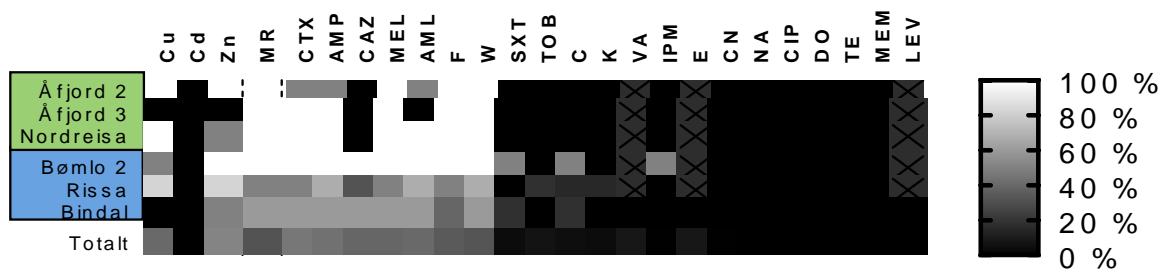
Kvart bakterieisolat vart testa for antibiotikaresistens ved bruk av standardisert EUCAST metodikk for hemmingssonetest med lappar tilsett antibiotika, samt minste hemmande konsentrasjons (MIC)-test for tungmetalla koppar, sink og kadmium. Datasettet vart vurdert i to grupper; isolat dyrka fram utan antibiotika og isolat dyrka fram med antibiotika.

4.3.1 Bakterieisolat dyrka fram utan antibiotika

Totalt 75 isolat, derav 56 Gram-negative og 19 Gram-positive, vart dyrka fram utan antibiotika og testa for antibiotikaresistens. Totalt var 21 av desse isolata (28 %) sensitive ovanfor alle antibiotika som det vart testa for, og 28 isolat (37 %) var resistente mot eit eller to antibiotika. Totalt 26 (35 %) av isolata var resistente mot tre eller fleire antibiotika, og 25 (33 %) av desse vart klassifisert som multiresistente (MR). Blant desse var eit isolat resistent mot 12 antibiotika, medan hyppigast førekomande resistens blant isolata var mot cefotaxim (44 %) ampicillin (43 %), amoxicillin (40 %), ceftazidim (39 %), mecillinam (39 %), nitrofurantoin (34 %) og trimetoprim (33 %). Alle dei 75 isolata var sensitive ovanfor nalidiksinsyre, ciprofloxacin, doxosyklin, tetrasyklin, meropenem og levofloxacin. Blant dei 71 bakterieisolat testa for tungmetallresistens var 28 (39 %) resistent mot koppar og 35 (49 %) resistent mot sink. Alle isolata var sensitiv ovanfor kadmium. Andel resistente isolat frå dei ulike lokalitetane er framstilt i eit gradientkart i Figur 4, medan eit samandrag for dei lokalitetane der 50 % eller fleire av isolata var MR er vist i Figur 5 (Sj  Tabell 5 for utfyllande oversikt).



Figur 4: Gradientkart over andel (%) antibiotika- og tungmetallresistente bakterieisolat dyrka fram utan antibiotika ($n=75$, 71 for tungmetall), frå dei undersøkte lokalitetane, gradert frå svart (0 %) til kvit (100%), sortert etter antibiotika med flest resistente isolat. Forkortingar: Cu (koppar), Cd (koppar), Zn (sink), MR (multiresistent), CTX (cefotaxim), AMP (ampicillin), CAZ (ceftazidim), MEL (mecillinam), AML (amoxicillin), F (nitrofurantoin), W (trimetoprim), SXT (trimetoprim/sulfametoksazol), TOB (tobramycin), C (kloramfenikol), IPM (imipenem), E (erytromycin), CN (gentamicin), NA (nalidiksinsyre), CIP (ciprofloxacilin), DO (doxysyklin), TE (tetrasyklin), MEM (meropenem), LEV (levofloxacin), ■ (mangler data).



Figur 5: Gradientkart over lokalitetar der $\geq 50\%$ av undersøkte isolat dyrka fram utan antibiotika, vart klassifisert som multiresistent (MR), andel (%) resistente isolat mot tungmetall og antibiotika, samt samla gjennomsnitt for den testa gruppa ($n=75$, 71 for tungmetall). Forkortingar: Cu (koppar), Cd (koppar), Zn (sink), MR (multiresistent), CTX (cefotaxim), AMP (ampicillin), CAZ (ceftazidim), MEL (mecillinam), AML (amoxicillin), F (nitrofurantoin), W (trimetoprim), SXT (trimetoprim/sulfametoksazol), TOB (tobramycin), C (kloramfenikol), IPM (imipenem), E (erytromycin), CN (gentamicin), NA (nalidiksinsyre), CIP (ciprofloxacilin), DO (doxysyklin), TE (tetrasyklin), MEM (meropenem), LEV (levofloxacin), ■ (mangler data).

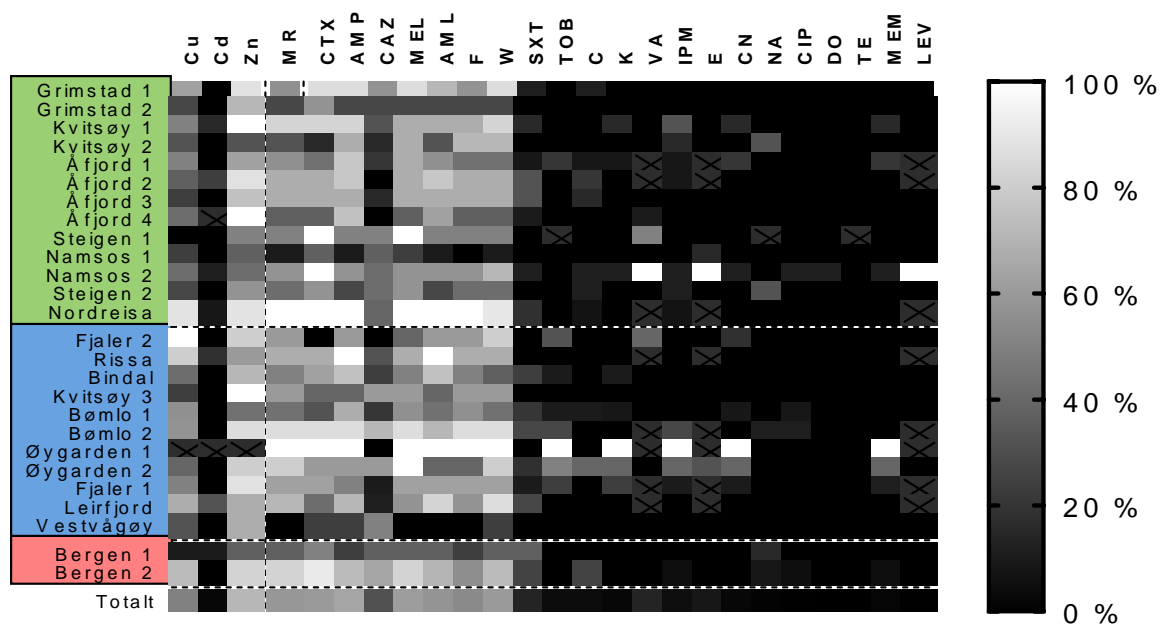
4.3.2 Bakterieisolat dyrka fram med antibiotika

Ved å dyrke fram bakteriar ved hjelp av medier tilsett antibiotika får ein eit selektivt søk etter bakteriar med resistenseigenskapar. Det var venta at isolata ville ha høgare førekomst av resistent mot det antibiotikumet som vart nytta som selektiv faktor. Blant isolata frå medier med ampicillin var 83 % resistent mot ampicillin, medan 48 % av isolata frå medier med ceftazidim var resistent mot ceftazidim.

Frå medier tilsett ciprofloxacin og imipenem vart det lågare andel av resistente isolat med høvesvis 5 % og 23 %, men dette gav likevel fleire resistente isolat til datasettet, enn ved å berre dyrke fram bakteriar utan tilsett antibiotika.

Totalt 177 bakterieisolat, 139 Gram-negative og 33 Gram-positive, frå fire MH-skåler tilsett enten ampicillin (n=42), ceftazidim (n=62), ciprofloxacin (n=41) eller imipenem (n=31), vart enkeltvis testa for resistens mot antibiotika og tungmetall. Blant desse var 28 (16 %) isolat sensitive mot alle antibiotika det vart testa for, og 37 (21 %) var resistent mot ein eller to (< 3) antibiotika. Det var 112 (63 %) isolat som var resistent mot tre eller fleire antibiotika, 104 av desse (59 %) vart klassifisert som MR. Ei framstilling av andel MR er vist i Figur 6, medan ei samla oversikt i Tabell 6. Eit av desse isolata var resistent mot alle 18 antibiotika det vart testa for, medan to andre isolat var resistent mot høvesvis 13 og 12 antibiotika. Samla sett vart førekkomsten av isolat resistente mot ceftazidim lågare (32 % mot 39 %) etter selektiv dyrking, og resistens mot ciprofloxacin vart sett i 2 % av isolata. Det vart og funne isolat med resistens mot nalidiksinsyre (3 %), doxosykin (1 %) og levofloxacin (1 %), men med låg førekost, og alle isolata var framleis sensitive mot tetrasyklin.

Blant dei 161 bakterieisolat dyrka fram med antibiotika og testa for resistens mot tungmetall var 80 (50 %), 114 (71 %) og 9 (6 %) av isolata resistente mot høvesvis koppar, sink og kadmium.



Figur 6: Framstilling av andel (%) antibiotika- og tungmetallresistente bakterieisolat dyrka fram med antibiotika (n=177, 161 for tungmetall), frå dei undersøkte lokalitetane, gradert frå svart (0 %) til kvit (100%), sortert etter antibiotika med flest resistente isolat. Forkortingar: Cu (koppar), Cd (koppar), Zn (sink), MR (multiresistent), CTX (cefotaxim), AMP (ampicillin), CAZ (ceftazidim), MEL (mecillinam), AML (amoxicillin), F (nitrofurantoin), W (trimetoprim), SXT (trimetoprim/sulfametoksazol), TOB (tobramycin), C (kloramfenikol), IPM (imipenem), E (erytromycin), CN (gentamicin), NA (nalidiksinsyre), CIP (ciprofloxacin), DO (doxosykin), TE (tetrasyklin), MEM (meropenem), LEV (levofloxacin), ■ (mangler data).

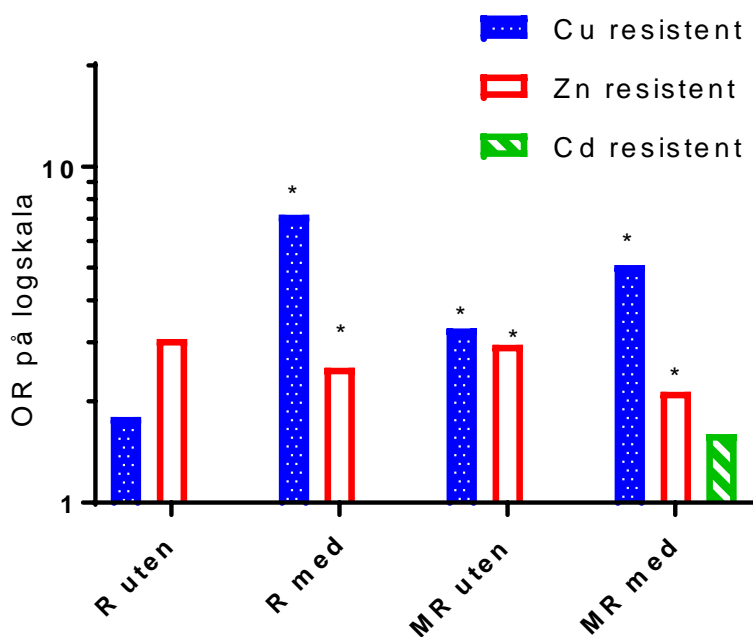
4.4 Samanheng mellom resistens mot tungmetall og antibiotika

4.4.1 Samanheng mellom tungmetallresistens og antibiotikaresistens/multiresistens

Samanhengsanalysar for resistens mot antibiotika og tungmetall vart utført separat for bakterieisolata dyrka fram utan og med antibiotika. Det vart og undersøkt for samanheng mellom tungmetallresistens og bakterieisolat klassifisert som multiresistent (MR) (Figur 7).

Blant bakterieisolata som var dyrka fram utan antibiotika ($n=71$) vart det sett ein samanheng mellom førekomst av kopparresistens og MR (OR 3,3 $p=0,02$), og mellom sinkresistens og MR (OR 3,0 $p=0,047$). Storparten av bakterieisolata var likevel verken MR og kopparresistente (47 %) eller MR og sinkresistente (39 %). Det vart naturleg nok ikkje funne liknande samanheng for førekomsten av kadmium og antibiotikaresistens då ingen av dei 75 bakterieisolata var resistente mot kadmium.

Blant bakterieisolata som vart dyrka fram med antibiotika ($n=161$) var samanhengen mellom kopparresistens og antibiotikaresistens meir utprega både for resistente (OR 7,2 $p<0,0001$) og MR (OR 5,1, $p<0,0001$). Blant desse var andelen isolat som verken var kopparresistente eller MR 32 %. Samanhengen mellom sinkresistens og MR minka (OR 2,1 $p=0,04$), sjølv om andelen verken sinkresistente og MR bakterieisolat og minka til 17 %. Det vart framleis ikkje vart sett noko samanheng mellom førekomst av kadmiumresistens og resistente eller MR bakterieisolat.

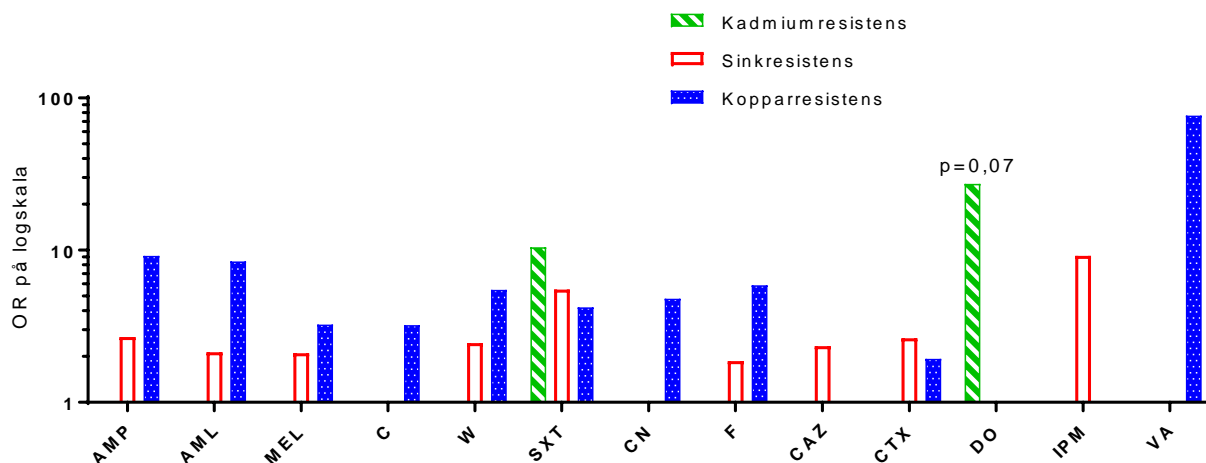


Figur 7: Samanhengsanalysar (Odds ratio, OR) mellom kvar av dei tre tungmetalla koppar (Cu), sink (Zn) og kadmium (Cd), og resistente bakterieisolat dyrka fram utan (R utan, $n=71$) og med antibiotika (R med, $n=161$), eller multiresistente bakterieisolat dyrka fram utan (MR utan, $n=71$) og med (MR med, $n=161$) antibiotika. Aukande OR tyder meir samanheng, men må sjåast i saman med antall n for analysen. * indikerar signifikant OR >1 med $p<0,05$.

4.4.2 Samanheng mellom tungmetallresistens og resistens mot enkelte antibiotikum

Basert på eit samla datasett ($n=225$, 171 Gram negative og 54 Gram positive) med bakteriar dyrka fram med og utan antibiotika, vart samanhengen mellom resistens mot kvart av tungmetalla koppar, sink og kadmium testa mot kvart av dei undersøkte antibiotika Figur 8. Sterkast samanheng vart sett for koppar

og vancomycinresistens (OR 76,7 $p=0,0001$), ampicillinresistens (OR 9,2 $p<0,0001$) og amoxicillinresistens (OR 8,4 $p<0,0001$). For sinkresistens vart det sett samanheng med imipenemresistens (OR $>9,2$ $p=0,012$) då alle isolata som var resistent mot imipenem og var resistent mot sink. Det vart og sett samanheng mellom sinkresistens og resistens mot trimetoprim/sulfametoksazol (OR 5,5 $p=0,029$). Sjølv om berre ni bakterieisolat var resistent mot kadmium, var det eine isolatet som var resistent mot doxysyklin og resistent mot kadmium, noko som førte til ein relativt høg OR (OR $>27,25$ $p=0,07$). Det vart og sett samanheng mellom kadmiumresistens og resistens mot trimetoprim/sulfametoksazol (OR 10,5 $p=0,002$).



Figur 8: Oversikt over samanhengen mellom resistens mot enkelte antibiotika og enkelte tungmetall, der samanhengar med signifikant Odds ratio (OR) ($p < 0,05$) er tatt med. Forkortingar: Cu (kopparr), Cd (kadmium) Zn (sink), AMP (ampicillin), AML (amoxicillin), MEL (mecillinam), C (kloramfenikol), W (trimetoprim), SXT (trimetoprim/sulfametoksazol), CN (gentamicin), F (nitrofurantoin), CAZ (ceftazidim), CTX (cefotaxim), DO (doxysyklin), IPM (imipenem), VA (vancomycin).

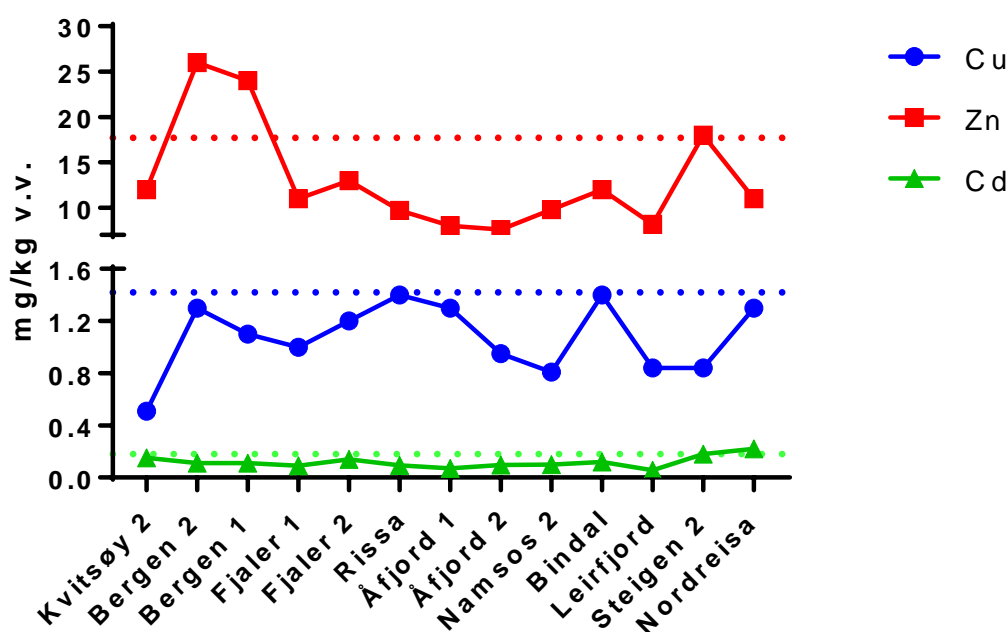
4.5 Identifiserte bakterieisolat

Dei bakterieisolata som viste resistens mot flest antibiotika, mellom 5 og 13 antibiotika, vart identifisert ved hjelp av 16S rRNA gensekvensering. Totalt 11 bakterieisolat dyrka fram utan antibiotika, frå 8 ulike lokalitetar, hadde resistens mot mellom 7 og 9 antibiotika, inkludert penicillinar og 3. gen. cefalosporinar. Isolata vart identifisert som *Acinetobacter movanagherensis* (1), *Erwinia rhapsontici* (1), *Flavobacterium frigidimaris* (1), *Pedobacter nyackensis* (1), *Pseudoalteromonas prydzensis* (1), *Pseudomonas brenneri* (2), *P. helmanticensis* (2), *P. koreensis* (1) og *Shewanella baltica* (1). *Pseudomonas brenneri* og *Acinetobacter movanagherensis* var resistent mot 9 ulike antibiotika, men begge var sensitive for kinolonar, tetrasyklinar og karbapenemar.

Blant bakterieisolata dyrka fram med antibiotika vart det identifisert isolat frå alle dei 17 lokalitetane. Totalt 28 isolat med resistens mot mellom 5 og 13 antibiotika vart identifisert som *Achromobacter spanius* (1), *Acinetobacter calcoaceticus* (1), *A. guillouiae* (1), *Bacillus cereus* (1), *Carnobacterium divergens* (1), *Delftia acidovorans* (2), *Escherichia fergusonii* (1), *Janthinobacterium svalbardensis* (1), *Pseudomonas baetica* (3), *P. helmanticensis* (1), *P. koreensis* (2), *P. protegens* (1), *P. putida* (1), *P. umsongensis* (1), *Stenotrophomonas maltophilia* (5), *S. pavanii* (1), *Vibrio anguillarum* (3) og *Xanthomonas* sp. (1). Bakterieisolatet som viste resistens mot flest antibiotika (13) vart identifisert som *Stenotrophomonas maltophilia*, var likevel fullt sensitiv ovanfor kinolonane og tetrasyklinane. Sjå Tabell 7 for utvida resistensprofil for alle dei sekvenserte isolata.

4.6 Tungmetall i skjel

Konsentrasjonen av tungmetalla koppar, sink og kadmium vart analysert for blåskjel frå 13 lokalitetar ved hjelp av ICP-MS metodikk. Gjennomsnittet av tungmetall målt i våtvekt skjel var 1,07 mg/kg (min/maks 0,51/1,4 mg/kg) for koppar, 13,1 mg/kg (min/maks 7,6/26 mg/kg) for sink og 0,12 mg/kg (min/maks 0,056/0,22 mg/kg) for kadmium. Konsentrasjonar i skjel frå dei ulike lokalitetane er vist samla i Figur 9, og enkeltvis i Figur 12. Med unntak av Bergen 1, Bergen 2 og Nordreisa, var alle dei undersøkte skjela innanfor 95 persentilen for norske skjel dei siste ti åra [13], og ved eller under etablerte grenseverdier (PROREF) for naturleg førekomst av koppar (1,42 mg/kg), sink (17,7 mg/kg) og kadmium (0,18 mg/kg) [18] og innanfor klasse I for god miljøstatus [19]. Byfjorden i Bergen hadde høgare verdiar for sink med 26 og 24 mg/kg, men likevel innanfor klasse I (40 mg/kg). Blåskjel frå Nordreisa hadde kadmiumkonsentrasjon på 0,22 mg/kg, men og her innanfor klasse I (0,40mg/kg) [18, 19].



Figur 9: Konsentrasjon av tungmetalla koppar (Cu), sink (Zn) og kadmium (Cd) (mg/kg v.v.) i blåskjel frå 13 ulike lokalitetar. Stipla line visar PROREF [18] for skjel, Cu=1,42 mg/kg, Zn=17,7 mg/kg og Cd=0,18 mg/kg.

5 Diskusjon

Marine skjel frå 18 ulike lokalitetar vart undersøkt for å kartlegge førekomst av antibiotikaresistente bakteriar, samt førekomst og samanheng med resistens mot tungmetall.

Mengde antibiotikaresistente bakteriar i skjel

Kvantitativ dyrking vart gjennomført for å finne det generelle bakterietallet og talet på antibiotikaresistente bakteriar i skjela (Figur 2). Medianen for det generelle bakterietallet var $1,5 \times 10^4$ KDE/g, og sidan skålene med tilsett antibiotikum hadde ulike suksess med å selektere fram resistente bakterieisolat, vart bakterietallet justert etter kor stor andel av bakterieisolata frå dei enkelte skålene som faktisk var resistent mot antibiotikumet i skålene. Høgste bakterietal frå skåler tilsett antibiotika vart då sett for skåler med ampicillin og skåler med ceftazidim med median på høvesvis $8,3 \times 10^2$ KDE/g og $7,2 \times 10^2$ KDE/g, og utgjorde 5,4 % og 4,7 % av medianverdien for det generelle bakterietallet. Bakterietallet for ciprofloxacin og imipenem låg anten ved eller under deteksjonsgrensa, då medianen for begge var 10^2 KDE/g. Dette tyder på låg førekomst av resistens mot desse stoffa, og for ciprofloxacin bør det i tillegg nemnast at det vart nytta låg konsentrasjonar i skålene (0,06 mg/L), som anbefalt i litteraturen [8, 14, 20]. Til samanlikning er brytingspunktet for ciprofloxacinresistens hos *Pseudomonas* sp. 0,5 mg/L [20]. Sidan berre 5 % av bakterieisolata frå skåler med ciprofloxacin viste seg å vere resistent mot ciprofloxacin (justeringsfaktor på 5 %), verka ikkje den låge konsentrasjonen fremjande for resistente bakteriar slik det var ønska i dette oppsettet.

Tidlegare har marine skjel vore nytta i undersøkingar av antibiotikaresistens med fokus på resistens hos *E. coli* [21] eller med selektiv dyrking av resistente Enterobacteriaceae bakteriar [22], men sidan gjennomsnittet av *E. coli* berre var 0,01 % av det generelle bakterietallet, er *E. coli* ikkje egna som indikatororganisme for antibiotikaresistens i det marine miljø, anna enn for det som er tilført frå fekale kjelder [23].

Fenotypisk resistens mot antibiotika og tungmetall

Førekomst av antibiotikaresistente bakteriar i marine skjel vart undersøkt ved fenotypisk resistenstesting av isolat dyrka fram på vekstmediar utan tilsett antibiotika ($n=75$). Av desse var 65 % resistent mot færre enn tre antibiotika, medan 33 % var resistente mot fleire enn tre antibiotika i tre ulike klassar og med det klassifisert som multiresistente (MR). Andelen MR må sjåast i lys av at fleire vanlege miljøbakteriar har naturleg ibuande resistenseigenskapar, og at dette difor ikkje treng å vere bakteriar med tilført eller erverva antibiotikaresistens. Hyppigast førekommande resistens vart sett mot ampicillin, amoxicillin og mecillinam, ceftazidim og cefotaxim, samt nitrofurantoin og trimetoprim (Figur 4 og Tabell 5). Det vart ikkje funne fenotypisk resistens mot nalidiksinsyre, doxysyklin, tetrasyklin, meropenem og levofloxacin, og heller ikkje mot ciprofloxacin. Fråvær av ciprofloxacinresistens er eit godt teikn, då dette er eit antibiotikum som er kritisk viktig i human medisin [10]. Fenotypisk tungmetallresistens vart undersøkt ved å bruke brytningspunkt som foreslått av Resende et al. [16], og blant 71 av bakterieisolata dyrka fram utan antibiotika var 39 % og 49 % var resistent mot høvesvis koppar og sink. Det vart sett ein signifikant samanheng mellom isolat som var MR og samstundes resistent mot koppar og/eller sink. Ingen av desse isolata var resistent mot kadmium.

For å gjere ei selektert undersøking av antibiotikaresistente bakteriar, vart dei dyrka fram med antibiotika i vekstmediet, og ein forventa høgare førekomst av resistente bakteriar. Totalt 177 isolat vart testa for fenotypisk resistens. Likevel vart det ikkje sett auka førekomst av bakteriar med resistens (< 10 %) mot kloramfenikol, gentamicin, tobramycin, kanamycin, erytromycin, og vancomycin. Andelen av bakterieisolat klassifisert som MR auka frå 33 % til 59 % (Tabell 6), og eit av desse isolata var resistent mot alle 18 antibiotika det vart testa for. For dei antibiotika der ein såg sterkast auke i resistente isolat kan dette truleg vere knytt til førekomsten av ibuande resistensmekanismer og at vekstmedia med tilsett

antibiotika fremja vekst av bakteriar med slike eigenskapar. Førekomst av tungmetallresistens vart og auka til 50 % for koppar og 71 % for sink, samt at 6 % var resistent mot kadmium.

Samanheng mellom resistens mot antibiotika og tungmetall

Det samla datasettet med 228 bakterieisolata testa for resistens mot både tungmetall og antibiotika vart nytta til å undersøkje samanhengen mellom kvart enkelt tungmetall mot kvart enkelt antibiotika. Kopparresistens var kopla mot flest antibiotika og med sterkast kopling mot vancomycinresistens (OR 76,7 $p = 0,0001$), noko som er som forventa då blant anna *tcbB* genet, er kjent for å gje resistens mot både koppar og glykopeptidar [24, 25]. Det vart og funne signifikant samanheng mellom kopparresistens og resistens mot breispektra penicillinar, folsyrehemmare, nitrofurantoin, samt trimetoprim og trimetoprim/sulfametoksazol. Det vart og sett sterk samanheng mellom resistens mot sink og imipenem (OR), samt restens mot trimetoprim/sulfametoksazol. Det er og kjent fleire koplingar mellom sinkresistens og resistens mot andre antibiotika frå litteraturen [26]. Samanheng mellom kadmiumresistens og antibiotikaresistens vart sterkast kopla for doxysyklin, men og for trimetoprim/sulfametoksazol.

Artsidentifisering av bakteriar med mest resistens

Totalt 39 av bakterieisolata, både frå mediar utan og med antibiotika, som viste resistens mot flest antibiotika, vart artsidentifisert. Dominerande artar var bakteriar som er utbredt i fleire ulike miljø, inkludert det marine, som er ofte er opportunistiske patogene og med resistenseigenskapar som gjer at dei tolererar fleire ulike typar antibiotika. Blant dei 39 identifiserte artene, vart 14 klassifisert som tilhøyrande *Pseudomonas* spp. Denne slekta har både artar ein finn naturleg i miljøet, samt kliniske patogene isolat med stort fokus, som karbapenemresistente *P. aeruginosa* [27]. Mange av *Pseudomonas* spp. bakteriane har ibuande resistenseigenskapar som blant anna effluks pumper som gjer resistens mot fleire breispektra antibiotika som ampicillin, amoxicillin, kloramfenikol, trimetoprim, kanamycin og cefotaxim [20, 28], noko som stemmer godt overeins med isolata identifisert her. Eit av isolata vart identifisert som *Pseudomonas koreensis*, blant anna og påvist i jord [29], og viste resistens mot ciprofloxacin, gentamicin, tobramycin og ceftazidim. Desse er antibiotika som *Pseudomonas* sp. vanlegvis er sensitiv mot [20], og kan tyde på at desse isolata har fått tilført resistenseigenskapar frå andre kjelder. Likeeins er det for slekta med nest flest tilhøyrande isolat (seks), *Stenotrophomonas*, som ein og finn i mange miljø, inkludert i det marine miljø. Denne er også ein opportunistisk patogen, og har ibuande resistens mot ampicillin, amoxicillin, trimetoprim, gentamicin, tobramycin, kanamycin, cefotaxim, imipenem og meropenem [20]. Tre av desse isolata, identifisert som *Stenotrophomonas maltophilia*, viste resistens mot ceftazidim, eit antibiotikum som er anbefalt for behandling av infeksjonar med denne bakterien [30]. Det er i fleire tilfelle registrert resistens mot ceftazidim hos desse bakteriane, og det er truleg kopla mot endringar i kromosomet og ikkje mot opptak av mobile genetiske element [31]. *Stenotrophomonas maltophilia* har likevel evna til å ta opp mobile resistenseigenskapar, som til dømes genar som gjer resistens mot trimetoprim/sulfametoksazol [32], eit anna antibiotika anbefalt mot denne arten. Ingen av bakteriane som vart identifisert som *Stenotrophomonas maltophilia* var resistente mot trimetoprim/sulfametoksazol, men arten kan kanskje fungere som ein indikatororganisme for erverva resistens i marint miljø for enkelte viktige antibiotika.

Resistens og menneskeleg innverknad på lokalitetane

Kvar av lokalitetane vart klassifisert etter låg, medium og høg grad av menneskeleg innverknad basert på ulike faktorar (Tabell 1) som varslingar på miljøstatus.no, innbyggjartal per kommuneareal og innbyggjartal per kommunalt kystareal. Nivå for mengde *E. coli* i skjela undersøkt gjennom Mattilsynet sitt tilsynsprogram vart og vektlagt. Det var håp at ei slik inndeling skulle gjere det lettare å sjå skilnader mellom dei ulike lokalitetane. For å undersøke om prøvematerialet hadde vore eksponert for resistensdrivande tungmetall, vart blåskjel frå 13 lokalitetane analysert for innhald av koppar, sink og kadmium. Under vert det diskutert litt rundt dei lokalitetane som av ulike årsakar skilde seg ut i datasettet.

Det var totalt ni lokalitetar som ikkje hadde funn av noko MR bakteriar, og desse fordelte seg på fem lokalitetar med låg menneskeleg innverknad og fire med medium menneskeleg innverknad. Blant to av desse lokalitetane, Namsos 1 og Steigen 2, vart det heller ikkje funne noko isolat med resistens mot tungmetall.

Bergen var klassifisert som ein lokalitet med høg menneskeleg innverknad og hadde sinkkonsentrasjonar over det som er rekna som naturleg førekomst [18], med høvesvis 24 og 26 mg/kg v.v. for Bergen 1 og 2. Dette var noko lågare (45 mg/kg v.v.) enn det ein har sett på denne lokaliteten før [6]. I skjela vart det og funne høge verdiar av *E. coli* (690 MPN *E. coli*/100g), men det var låg førekomst av resistens mot sink (33 % og 25 %), og ingen resistens mot dei andre tungmetalla. Det vart og funne låg førekomst av MR bakteriar (0 % og 25 %) og det er difor vanskeleg å knytte sink i skjela til ei rolle som drivar av resistensutvikling ved Bergen 1 og 2. Blant bakterieisolat dyrka fram med antibiotika vart to MR artar identifisert, *Escherichia fergusonii* og *Vibrio anguillarum*, med høvesvis fekalt og marint opphav og begge med resistens mot ni ulike antibiotika.

Nordreisa var klassifisert som ein lokalitet med låg menneskeleg innverknad, men var den einaste lokaliteten med blåskjel over grensa for naturleg førekomst for kadmium. Nivået på 0,22 mg/kg v.v. kadmium er likevel under den tidlegare brukte grensa for Klasse I (0,4 mg/kg) og innanfor 95 percentilen for skjel i Mattilsynet sitt overvåkingsprogram [13]. Grunna analyserfeil finns ikkje data på *E. coli* i desse skjela, men blant dei to isolata som vart testa for resistens, var begge resistent mot koppar og eine resistent mot sink. Begge var MR bakteriar. Under utrekninga for menneskeleg innverknad vart Nordreisa gitt 2 poeng for miljøstatus grunna nærliggande oppdrettsanlegg (<5km), og sidan det mangla data på *E. coli* kan det tenkast at denne lokaliteten burde vore klassifisert med medium menneskeleg innverknad i staden. Blant bakterieisolata dyrka fram med antibiotika var alle 10 MR, åtte var resistent mot koppar og sink og eit isolat var resistent mot kadmium. Eit av MR isolata vart identifisert som *Stenotrophomonas maltophilia* og var resistent mot åtte ulike antibiotika.

Ved den eine lokaliteten i Åfjord vart det analysert eit parti blåskjel (Åfjord 2), eit parti hjarteskjel (Åfjord 3) og eit parti sandskjel (Åfjord 4), der blåskjela og hjarteskjela hadde *E. coli* nivå på 3500 MPN/100g. Hjarteskjela hadde og det høgste nivået av generelle bakteriar ($1,2 \times 10^7$ KDE/g), samanlikna med dei andre undersøkte skjela. Åfjord var likevel klassifisert som ein lokalitet med låg menneskeleg innverknad då der ikkje låg noko varsel for miljøstatus, og at innbyggjartalet per kommuneareal var mindre enn 5/km². Totalt var tre bakterieisolat frå Åfjord 2 og 3 testa. Eit var resistent mot koppar og sink, og alle var MR. Bakterieisolata dyrka fram med antibiotika frå denne lokaliteten visar høg andel resistens mot sink. Dei to identifiserte MR isolata frå Åfjord 2 og 3, var *Janthinobacterium svalbardensis* og *Pseudomonas putida*, og var resistent mot høvesvis sju og åtte ulike antibiotika.

Rissa vart klassifisert som medium menneskeleg innverknad grunna innbyggjartalet per kommuneareal og per kommunal havflate, samt sær høge nivå av *E. coli* i skjela, $1,6 \times 10^6$ MPN/100g. Innholdet av koppar var på 1,4 mg/kg og låg rett under grensa for naturleg førekomst, medan dei andre metalla var låge. Tre av seks bakterieisolat var MR og alle desse var og resistent mot koppar og sink. To av desse vart identifisert som *Acinetobacter movanagherensis* og *Pseudomonas helmanticensis*, og var resistent mot 9 og 7 antibiotika.

Bindal vart og klassifisert som medium menneskeleg innverknad grunna høg *E. coli* verdi, $1,6 \times 10^4$ MPN/100g, samt at det finns kosthaldsvarsel for kadmium i taskekrabbe i området, noko som kan tyde på høgare nivå av kadmium i området. Skjela frå Bindal hadde likevel lågt nivå av kadmium, medan koppar på 1,4 mg/kg låg rett under grensa for naturleg førekomst, slik som ved Rissa. Blant dei tre MR isolata, var to resistent mot sink, medan ingen var resistent mot koppar eller kadmium. Dei identifiserte isolata var *Erwinia rhapontici* og *Pseudoalteromonas prydzensis* og var resistent mot 8 og 7 antibiotika.

Bømlo 2 var og ein lokalitet som skilde seg ut med høgare *E. coli* nivå (330 MPN/100g) og der begge dei testa isolata var MR og resistent mot sink. Dessverre manglar det data på tungmetall frå desse skjela. Eit MR isolat vart resistent mot både koppar og sink og vart identifisert som *Pseudomonas brenneri*.

Det viste seg å vere særst vanskeleg å peike på tydelege resistensdrivande faktorar for lokalitetane med høgst førekomst av antibiotikaresistens og restens mot tungmetall. Ein kan sjå at alle lokalitetane som utpeikar seg med flest MR isolat har og høge nivå av *E. coli*. Dette kan ha samband med resistente bakteriar tilførte frå fekale kjelder, men sidan dei dominerande resistente bakterieartene var miljøbakteriar, kan det og tenkast at det ved lokalitetar med tilførsel av fekal forureining, og er tilførsel av anna forureining med resistensdrivande faktorar som ikkje vart fanga opp denne undersøkinga her. Valet av lokalitet med antatt høg menneskeleg innverknad skulle helst ha vore eit område med meir utprega forureining enn det som viste seg å vere tilfelle i Bergen. I dei tilfella der tungmetallkonsentrasjonane er låge, vil små variasjonar i større grad vere avhengig av skjelets fysiologi, der veksthastighet, storleik og alder vil ha innverknad på mengde akkumulert tungmetall frå vatnet [33].

6 Konklusjonar

Denne rapporten presenterar undersøking av antibiotikaresistens hos bakteriar frå norske marine skjel der dette for fyrste gong er undersøkt utan artseleksjon. Denne tilnærminga gir eit innblikk i både naturleg førekomande og tilførte resistente bakteriar. Samla sett var 65 % av bakterieisolata resistente mot mindre enn tre antibiotika, medan 33 % vart klassifisert som multiresistente. Samstundes vart det ikkje funne resistens mot fleire klinisk viktige antibiotikum som doxysyklin, tetrasyklin, meropenem, levofloxacin, og ciprofloxacin. Resultata viser sterkast kopling mellom resistens mot koppar og fleire antibiotika.

Det var særleg vanskeleg å få eit godt bilete på samanheng mellom antibiotikaresistens og menneskeleg innverknad på lokalitetane. Skjela i Bergen hadde høgste konsentrasjonar av koppar, men låg førekomst av bakteriar med resistens mot antibiotika eller tungmetall, medan skjela frå Nordreisa hadde høgast konsentrasjon av kadmium, og her vart det funne multiresistente bakteriar og bakteriar med resistens mot koppar og sink. Likevel, ved dei lokalitetane der meir enn 50 % av bakterieisolata vart klassifisert som multiresistente, hadde alle skjela og høge nivå av *E. coli*. Sidan dei identifiserte resistente isolata ikkje var fekale bakteriar, men miljøbakteriar, kan det tenkast at dei lokalitetane som har tilførsel av fekal forureining og har tilførsel av anna menneskeleg forureining som ikkje vart fanga opp denne undersøkinga. Dette kan kanskje kunne fangast opp dersom ein undersøker områder med meir kjent menneskeleg innverknad.

E. coli vert ofte nytta som indikatororganisme for hygienisk status i skjel, men våre undersøkingar viste at og andre bakteriar bør og inkluderast dersom ein vil overvake antibiotikaresistens i marint miljø.

7 Anbefalingar for vidare arbeid

Det er å tilrå at resistenseigenskapane ein observerte i dette arbeidet også vert undersøkte på gen-nivå. Fullgenomanalysar av miljøbakteriane vil kunne gje nyttig informasjon om samanhengane mellom antibiotikaresistens og tungmetallresistens, og om desse genane vil ha eit potensiale for å spreie seg til bakteriar i andre miljø. Metagenomstudiar vil og kunne gje nyttig informasjon om førekomst av antibiotikaresistensgenar i prøvematerialet.

Lengre tidsseriar for skjel frå eit utval lokalitetar undersøkt med lik metodikk, vil kunne gje data for bakgrunnsresistens i miljøet og avdekke svingingar i resistensførekomst. For å undersøke nærare effektar av menneskeleg innverknad, bør det inkluderast andre område enn dei som inngår i Mattilsynet sitt tilsynsprogram, og i større grad leggast fokus på lokalitetar med kjent forureining, som til dømes ved enkelte av dei norske fjordane.

For å kunne kartlegge for antibiotikaresistens i det akvatiske miljø vil det og vere formålstenleg å undersøkje andre artar og sedimentar frå ein bestemt lokalitet. Blåskjel er ein god indikatororganisme for vatnet i området, men artar som vert eldre, samt bunnfauna og sediment vil og kunne gje nyttig informasjon.

8 Tabellar og vedlegg

Tabell 3: Utrekningstabell for menneskeleg innverknad på lokaliteter basert på fire faktorar; miljøstatus, innbyggjartal per kommunal havflate (km²), og innbyggjartal per kommunalt landareal (km²), samt førekomst av *E. coli* (MPN/100g) i skjelprøven frå lokaliteten.

	Miljøstatus ¹	Innbyggjartal/havflate ²	Innbyggjartal/areal ³	<i>E. coli</i> /100 g ⁴	Sum ⁵
Grimstad 1-2	1	2	2	1	6
Kvitsøy 1-2	2	1	2	1	6
Kvitsøy 3	2	1	2	2	7
Bømlo 1-2	1	2	2	2	7
Bergen 1-2	3	3	3	2	11
Øygarden 1-2	2	2	2	1	7
Fjaler 1	2	2	2	1	7
Fjaler 2	2	2	2	2	8
Rissa	1	2	2	3	8
Åfjord 1	2	2	1	1	6
Åfjord 2-4	1	2	1	2	6
Namsos 1	1	2	2	1	6
Namsos 2	1	2	2	1	6
Bindal	2	1	1	3	7
Leirfjord	1	2	2	3	8
Steigen 1-2	3	1	1	1	6
Vestvågøy	3	2	2	1	8
Nordreisa	2	2	1	-	5

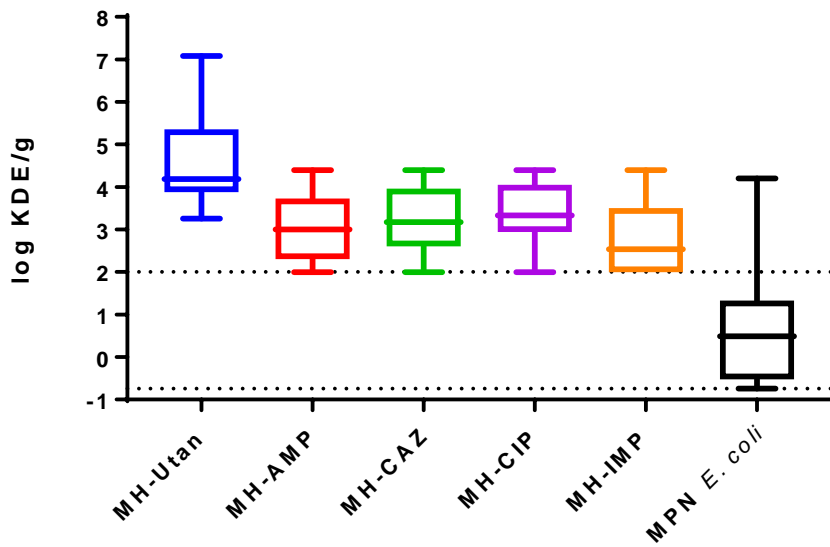
¹ www.miljøstatus.no: 1=ingen varsel, 2 =nærliggende (<5km) varsel, 3=varsel på området [7]

² Kommune innbyggjar/ kommune havflateareal: 1=<5 innbyggjarar /km², 2=5-<200 innbyggjarar /km², 3=≥200 innbyggjarar /km²[9, 34]

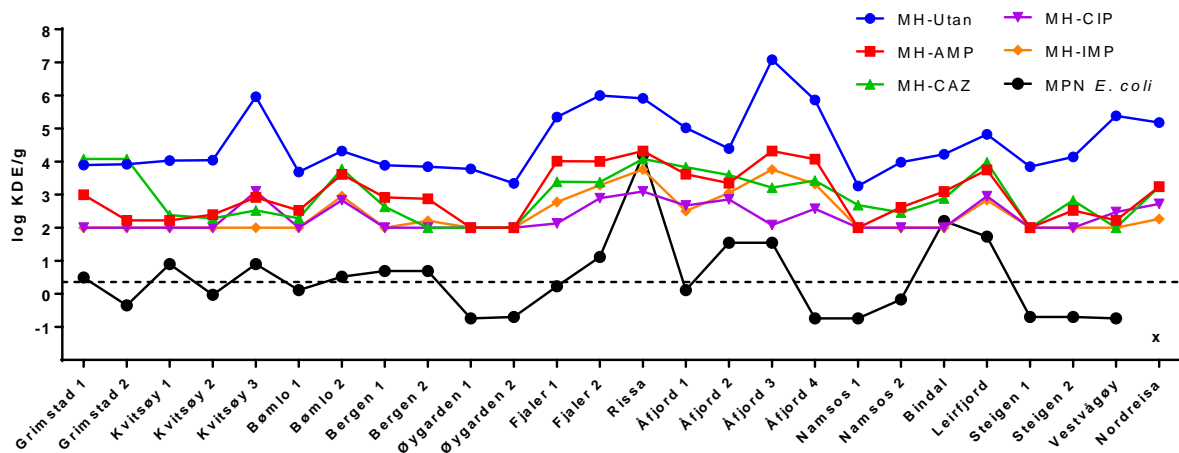
³ Kommune innbyggjartal/ kommune fastlandareal: 1=<5 innbyggjarar /km², 2=5-<200 innbyggjarar /km², 3=≥200 innbyggjarar /km² [34]

⁴ MPN *E. coli*/100 gram skjel. 1=<230/100g, 2= ≥230/100g -<4600/100g, 3=≥4600/100g.

⁵ 4-6 =låg, 7-9=medium,10-12=høg.



Figur 10: Medianverdi (n=26) med spekter for ikkje-faktorjusterte bakterietal (log KDE/g) frå MH-agar utan antibiotika, MH med 50 mg/L ampicillin (AMP), MH med 2 mg/L ceftazidim (CAZ), MH med 0,06 mg/L ciprofloxacin (CIP), MH med 10 mg/L imipenem (IPM) og MPN/g E. coli. Stipla line indikerar deteksjonsgrensa <100 KDE/g (2 log). MPN E. coli har deteksjonsgrensa <18/100g (-0,74 log).



Figur 11: Faktorjustert bakterietal (log KDE/g) i skjel frå ulike lokaliteter (n=26) dyrka fram på MH-agar utan antibiotika, MH med 50 mg/L ampicillin (AMP), MH med 2 mg/L ceftazidim (CAZ), MH med 0,06 mg/L ciprofloxacin (CIP), MH med 10 mg/L imipenem (IPM) og MPN/g E. coli. Stipla line viser grenseverdi 2,30 MPN/g (0,36 log) for E. coli ved rein lokalitet. X= ikkje analysert for E. coli.

Tabell 4: Oversikt over lokaliteter og kvalitativ påvising av antibiotikaresistens ved hjelp av påvist/ikkje påvist vekst i røyr med Nutrient buljong tilsett enten 50 mg/L ampicillin (AMP), 2 mg/L ceftazidim (CAZ), 0,06 mg/L ciprofloxacin (CIP), eller 10 mg/L imipenem (IPM).

Lokalitet	AMP	CAZ	CIP	IMP
Grimstad 1	Påvist	Påvist	Ikkje påvist	Ikkje påvist
Grimstad 2	Påvist	Påvist	Påvist	Ikkje påvist
Kvitsøy 1	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Kvitsøy 2	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Kvitsøy 3	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Bømlo 1	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Bømlo 2	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Bergen 1	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Bergen 2	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Øygarden 1	Ikkje påvist	Ikkje påvist	Påvist	Ikkje påvist
Øygarden 2	Ikkje påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Fjaler 1	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Fjaler 2	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Rissa	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Åfjord 1	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Åfjord 2	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Åfjord 3	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Åfjord 4	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Namsos 1	Påvist	Påvist	Påvist	Ikkje påvist
Namsos 2	Påvist	Påvist	Påvist	Ikkje påvist
Bindal	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Leirfjord	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist
Steigen 1	Påvist	Påvist	Påvist	Ikkje påvist
Steigen 2	Påvist	Påvist	Påvist	Ikkje påvist
Vestvågøy	Påvist	Påvist	Ikkje påvist	Ikkje påvist
Nordreisa	Påvist	Påvist	Påvist	Påvist

Tabell 5: Oversikt over talet (n) bakterieisolat frå ulike lokalitetar, dyrka fram på medier utan antibiotika, testa for resistens mot tungmetalla koppar, sink og kadmium, samt eit utval antibiotika. Tabellen visar andelen (%) av n frå lokalitet som viste resistens. Andel resistens > 50 % er markert med raudt. Total n = 75 (71 for tungmetall). Siste line visar gjennomsnitt andel resistente isolat for gruppa.

Utan AB	n isolat	Cu	Cd	Zn	AMP	AML	MEL	C	W	SXT	NA	CIP	CN	TOB	K	F	CAZ	CTX	DO	TE	IPM	MEM	LEV	E	VA	MR	
Grimstad 1	2 (1)	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grimstad 2	4 (4)	25	0	25	25	25	50	0	25	0	0	0	0	33	25	0	25	25	0	0	0	0	0	0	0	0	25
Kvitsøy 1	2 (1)	0	0	100	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Kvitsøy 2	2 (2)	100	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	
Kvitsøy 3	1 (1)	0	0	100	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-	0	0	100	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0
Bømlo 1	3 (3)	100	0	67	33	33	33	0	33	33	0	0	0	0	0	67	0	33	0	0	0	0	0	-	-	-	33
Bømlo 2	2 (2)	50	0	100	100	100	100	50	100	50	0	0	0	0	0	100	100	100	0	0	50	0	-	-	-	100	0
Bergen 1	3 (3)	0	0	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	33	33	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bergen 2	4 (4)	0	0	25	50	25	25	0	0	0	0	0	0	25	25	25	25	50	0	0	0	0	-	-	-	25	0
Fjaler 1	5 (6)	17	0	17	75	75	50	25	40	0	0	0	0	0	0	40	75	50	0	0	0	0	-	-	-	40	0
Fjaler 2	1 (1)	100	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	0	0
Rissa	6 (6)	83	0	83	67	67	50	17	67	0	0	0	0	20	17	50	33	50	0	0	0	0	0	-	-	-	50
Åfjord 1	5 (5)	40	0	60	40	40	60	20	0	0	0	0	20	50	40	40	40	60	0	0	0	0	0	0	0	33	40
Åfjord 2	2 (1)	100	0	100	50	50	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	50	0	0	0	0	-	-	-	100	0
Åfjord 3	1 (1)	0	0	0	100	0	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	-	-	-	100	0
Åfjord 4	0 (1)	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Namsos 1	4 (4)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	-	0	0	0	0	0	-	0	0	0	50	0	0	0
Namsos 2	7 (7)	29	0	43	29	29	29	0	29	14	0	0	14	25	14	29	86	71	0	0	14	0	0	0	0	0	29
Bindal	5 (4)	0	0	50	60	60	60	20	60	20	0	0	0	0	0	40	60	60	0	0	0	0	0	0	0	0	60
Leirfjord	7 (7)	71	0	57	71	71	43	14	43	14	0	0	0	0	0	43	14	29	0	0	0	0	-	-	-	43	0
Steigen 2	1 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vestvågøy	4 (4)	50	0	75	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nordreisa	2 (2)	100	0	50	100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0	0	-	-	-	100
Totalt	75 (71)	39	0	49	43	40	39	9	33	8	0	0	3	9	8	34	39	44	0	0	3	0	0	11	11	33	

Tal i parentes () er talet på isolat frå gitt lokalitet testa for metallresistens. Forkortingar: Cu (koppar), Cd (kadmium), Zn (sink), AMP (ampicillin), AML (amoxicillin), MEL (mecillinam), C (kloramfenikol), W (trimetoprim), SXT (trimetoprim/sulfametoksazol), NA (nalidiksinsyre), CIP (ciprofloxacilin), CN (gentamicin), TOB (tobramycin), K (kanamycin), F (nitrofurantoin), CAZ (ceftazidim), CTX (cefotaxim), DO (doxysyklin), TE (tetrasyklin), IPM (imipenem), MEM (meropenem), LEV (levofloxacin), E (erytromycin), VA (vancomycin), MR (multiresistent).

Tabell 6: Oversikt over talet (n) bakterieisolat frå ulike lokalitetar, dyrka fram på medier med antibiotika, testa for resistens mot tungmetalla koppar, sink og kadmium, samt eit utval antibiotika. Tabellen visar andelen (%) av n frå lokalitet som viste resistens. Andel resistens > 50 % er markert med raudt. Total n = 177 (161 for tungmetall). Siste line visar gjennomsnitt andel resistente isolat for gruppa.

Med AB	n isolat	Cu	Cd	Zn	AMP	AML	MEL	C	W	SXT	NA	CIP	CN	TOB	K	F	CAZ	CTX	DO	TE	IPM	MEM	LEV	E	VA	MDR	
Grimstad 1	9 (8)	63	0	88	86	71	86	14	86	14	0	0	0	0	0	57	57	86	0	0	0	0	0	0	0	0	56
Grimstad 2	7 (7)	29	0	71	29	29	29	0	29	0	0	0	0	0	0	29	29	57	0	0	0	0	0	0	0	0	29
Kvitsøy 1	6 (6)	50	17	100	83	67	67	0	83	17	0	0	17	0	17	67	33	83	0	0	33	17	0	0	0	0	83
Kvitsøy 2	7 (6)	33	0	33	67	33	67	0	71	0	33	0	0	0	0	71	17	17	0	0	17	0	0	0	0	0	33
Kvitsøy 3	5 (4)	25	0	100	40	40	60	0	60	0	0	0	0	0	0	60	60	40	0	0	0	0	0	0	0	0	60
Bømlo 1	9 (6)	56	0	44	67	44	56	13	44	22	0	11	11	13	11	56	22	33	0	0	0	0	0	0	0	0	44
Bømlo 2	7 (7)	57	0	86	86	71	86	0	86	29	14	14	0	29	0	86	71	86	0	0	29	0	-	-	-	-	86
Bergen 1	8 (8)	13	13	38	25	38	38	0	38	38	17	0	0	0	0	25	38	50	0	0	0	0	0	0	0	0	38
Bergen 2	11 (11)	73	0	82	73	70	82	27	73	27	11	9	0	0	0	55	64	91	0	0	9	9	0	0	0	0	82
Øygarden 1	1 (0)	-	-	-	100	100	100	0	100	0	0	0	100	100	100	100	0	100	0	0	100	100	-	-	-	-	100
Øygarden 2	5 (5)	40	0	80	60	40	100	40	80	20	0	0	40	50	40	40	60	60	0	0	40	40	0	33	0	0	80
Fjaler 1	8 (8)	50	0	88	50	63	63	0	63	13	0	0	13	25	25	63	13	63	0	0	13	14	-	-	-	-	63
Fjaler 2	5 (5)	100	0	80	60	60	40	0	80	0	0	0	20	33	0	60	0	0	0	0	0	0	0	0	40	60	
Rissa	6 (5)	80	20	60	100	100	67	0	67	0	0	0	0	0	0	67	33	67	0	0	0	0	-	-	-	-	67
Åfjord 1	9 (8)	50	0	63	78	56	67	11	44	11	0	0	22	22	11	44	22	44	0	0	11	22	-	-	-	-	56
Åfjord 2	9 (8)	38	25	88	78	78	67	22	67	33	0	0	0	0	0	67	0	67	0	0	11	0	-	-	-	-	67
Åfjord 3	6 (4)	25	0	75	67	67	67	17	67	33	0	0	0	0	0	67	17	67	0	0	0	0	0	0	0	0	67
Åfjord 4	8 (7)	43		100	75	63	38	0	38	13	0	0	0	0	0	38	0	38	0	0	0	0	0	0	0	13	38
Namsos 1	8 (8)	25	0	38	13	13	25	0	13	0	0	0	0	0	0	0	38	38	0	0	0	0	0	17	0	0	13
Namsos 2	7 (7)	43	14	43	57	57	57	14	71	14	0	14	14	0	14	57	43	100	14	0	14	14	100	100	100	0	57
Bindal	8 (7)	43	0	71	75	75	50	0	38	25	0	0	0	13	13	50	25	63	0	0	0	0	0	0	0	0	50
Leirfjord	7 (6)	67	33	67	71	83	57	0	86	29	0	0	0	0	0	57	14	43	0	0	0	0	-	-	-	-	71
Steigen 1	2 (2)	0	0	50	50	50	100	0	50	0		0	0		0	50	50	100	0		0	0	0	0	50	50	
Steigen 2	7 (7)	29	0	57	29	29	57	14	43	0	33	0	0	0	0	43	43	57	0	0	14	0	0	0	0	0	43
Vestvågøy	4 (3)	33	0	67	25	0	0	0	25	0	0	0	0	0	0	0	50	25	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Nordreisa	10 (9)	89	11	89	100	100	100	10	90	20	0	0	0	0	0	100	40	100	0	0	10	0	-	-	-	-	100
Totalt	177 (161)	50	6	71	64	58	61	8	60	16	4	2	6	8	6	54	32	60	1	0	9	5	3	11	16	59	

Tal i parentes () er talet på isolat frå gitt lokalitet som vart testa for metallresistens. Forkortingar: Cu (koppar), Cd (kadmium), Zn (sink), AMP (ampicillin), AML (amoxicillin), MEL (mecillinam), C (kloramfenikol), W (trimetoprim), SXT (trimetoprim/sulfametoksazol), NA (nalidiksinsyre), CIP (ciprofloxacin), CN (gentamicin), TOB (tobramycin), K (kanamycin), F (nitrofurantoin), CAZ (ceftazidim), CTX (cefotaxim), DO (doxysyklin), TE (tetrasyklin), IPM (imipenem), MEM (meropenem), LEV (levofloxacin), E (erytromycin), VA (vancomycin), MR (multiresistent).

Tabell 7: Rådata for antibiotika- og tungemettallresistens for bakterieisolata identifisert med 16S rRNA gensekvensering.

Lokalitet	Skjel	Medie	Gram	Temp.	Art	Cu	Cd	Zn	AMP	AML	MEL	C	W	SXT	NA	CIP	CN	TOB	K	F	CAZ	CTX	DO	TE	IPM	MEM	LEV	E	VA	
Børnlo 1	Østers	MH CAZ	Negativ	35 °C	<i>Pseudomonas baetica</i>	-	-	-	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	-	-	-	
Børnlo 1	Østers	MH CAZ	Negativ	25 °C	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	-	-	-	
Børnlo 2	Blåskjell	MH CAZ	Negativ	25 °C	<i>Pseudomonas brenneri</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Kvitsøy 2	Blåskjell	MH CAZ	Negativ	35 °C	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	-	-	-
Kvitsøy 1	Østers	MH CIP	Negativ	35 °C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	-	-	-	
Kvitsøy 1	Østers	MH CIP	Negativ	35 °C	<i>Delftia acidovorans</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	-	-	-
Kvitsøy 1	Østers	MH CAZ	Negativ	35 °C	<i>Acinetobacter quillouiae</i>	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Kvitsøy 3	Kamskjell	MH CAZ	Negativ	35 °C	<i>Achromobacter spanius</i>	-	-	-	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Åfjord 1	Blåskjell	MH utan	Positiv	25 °C	<i>Pedobacter nyackensis</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	-	0	1	-	1	0	1	1	0	-	0	0	0	0	1	
Åfjord 3	Hjerteskjell	MH CAZ	Negativ	25 °C	<i>Janthinobacterium svalbardensis</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	-	-	
Åfjord 2	Blåskjell	MH CAZ	Negativ	35 °C	<i>Pseudomonas putida</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	-	-	
Nordreisa	Blåskjell	MH IMP	Negativ	35 °C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	-	-	
Leirfjord	Blåskjell	MH utan	Negativ	25 °C	<i>Flavobacterium frigidimaris</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Leirfjord	Blåskjell	MH utan	Negativ	25 °C	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	-	-	
Fjaler 1	Blåskjell	MH utan	Negativ	25 °C	<i>Shewanella baltica</i>	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Fjaler 1	Blåskjell	MH IMP	Negativ	35 °C	<i>Stenotrophomonas pavanii</i>	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	-	-	-	
Bindal	Blåskjell	MH utan	Negativ	25 °C	<i>Erwinia rhapontici</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Bindal	Blåskjell	MH utan	Negativ	25 °C	<i>Pseudalteromonas prydzensis</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Rissa	Blåskjell	MH utan	Negativ	25 °C	<i>Acinetobacter movanagherensis</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	-	-	-	
Rissa	Blåskjell	MH utan	Negativ	25 °C	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-
Namsos 2	Blåskjell	MH utan	Negativ	35 °C	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Namsos 2	Blåskjell	MH AMP	Positiv	35 °C	<i>Pseudomonas baltica</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	0	-	0	0	-	0	1	0	1	0	-	0	0	0	0	1	1
Bergen 1	Blåskjell	MH IMP	Negativ	25 °C	<i>Vibrio anguillarum</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	-	-	-	
Bergen 1	Blåskjell	MH CIP	Negativ	35 °C	<i>Escherichia fergusonii</i>	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Bergen 2	Blåskjell	MH IMP	Negativ	25 °C	<i>Vibrio anguillarum</i>	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Bergen 2	Blåskjell	MH IMP	Negativ	25 °C	<i>Vibrio anguillarum</i>	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	-	-	-
Grimstad 1	St.østers	MH CAZ	Negativ	35 °C	<i>Pseudomonas koreensis</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Grimstad 1	St.østers	MH AMP	Negativ	25 °C	<i>Pseudomonas baltica</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Grimstad 2	Blåskjell	MH utan	Negativ	25 °C	<i>Pseudomonas brenneri</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Øygarden 2	Blåskjell	MH CAZ	Positiv	35 °C	<i>Bacillus cereus</i>	0	0	1	1	0	1	0	1	1	-	0	0	-	0	0	1	1	0	-	0	0	0	0	0	
Øygarden 2	Blåskjell	MH IMP	Negativ	35 °C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	-	-	
Øygarden 2	Blåskjell	MH CIP	Negativ	35 °C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	-	-	
Øygarden 1	Kamskjell	MH CIP	Negativ	35 °C	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	-	-	
Fjaler 2	Blåskjell	MH CAZ	Positiv	35 °C	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	1	0	0	1	1	1	0	1	0	-	0	0	-	0	1	0	0	0	-	0	0	0	0	0	1
Fjaler 2	Blåskjell	MH CIP	Negativ	35 °C	<i>Delftia acidovorans</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	-	-	-	
Steigen 2	Blåskjell	MH AMP	Negativ	35 °C	<i>Pseudomonas protegens</i>	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Steigen 2	Blåskjell	MH CAZ	Negativ	35 °C	<i>Xanthomonas spp.</i>	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	-	-	
Steigen 2	Blåskjell	MH CIP	Negativ	35 °C	<i>Carnobacterium divergens</i>	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	-	-	-	
Steigen 1	Kuskjell	MH AMP	Positiv	35 °C	<i>Pseudomonas helmanticensis</i>	0	0	0	1	1	1	0	1	0	-	0	0	-	0	1	0	1	0	-	0	0	0	0	1	

Sensitiv = 0, resistent = 1. Forkortingar: Cu (koppar), Cd (kadmium) Zn (sink), AMP (ampicillin), AML (amoxicillin), MEL (mecillinam), C (kloramfenikol), W (trimetoprim), SXT (trimetoprim/sulfametoksazol), NA (nalidiksinsyre), CIP (ciprofloxacin), CN (gentamicin), TOB (tobramycin), K (kanamycin), F (nitrofurantoin), CAZ (ceftazidim), CTX (cefotaxim), DO (doxysyklin), TE (tetrasyklin), IPM (imipenem), MEM (meropenem), LEV (levofloxacin), E (erytromycin), VA (vancomycin), St. østers (stillehavsosters).

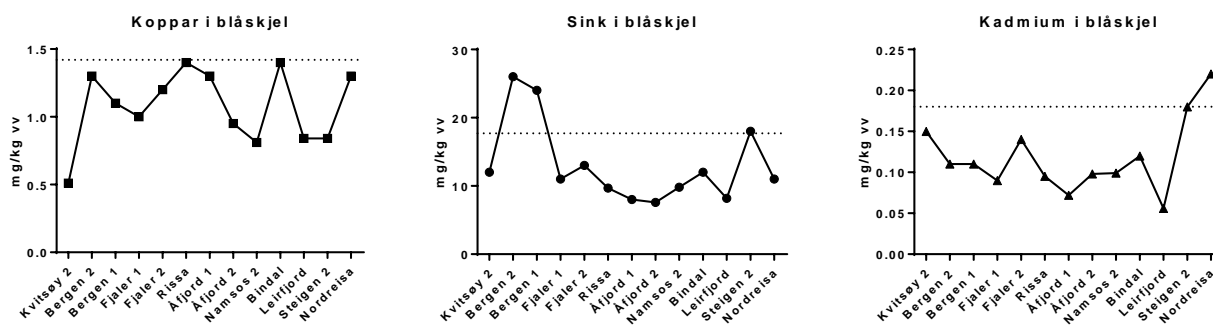
Tabell 8: Oversikt over referansestammene for positiv og negativ kontroll nytta i dyrkingsoppsetta.

Parameter	Positiv kontroll	Negativ kontroll
MH-agar og Nutrient-buljong	<i>E. coli</i> CCUG 2468	Ingen
MH-agar og Nutrient -buljong med 50mg/L AMP	VI: 58245 ¹⁾	<i>E. coli</i> CCUG 2468
MH-agar og Nutrient -buljong med 2mg/L CTZ	VI: 58245 ¹⁾	<i>E. coli</i> CCUG 2468
MH-agar og Nutrient -buljong med 0.06mg/L CPR	VI: 58235 ¹⁾	<i>E. coli</i> CCUG 2468
MH-agar og Nutrient -buljong med 10mg/L IMP	VI: 58245 ¹⁾	<i>E. coli</i> CCUG 2468
EUCAST kvalitetskontroll	<i>E. coli</i> 17620	

¹⁾ mottatt frå Veterinærinstituttet.

Tabell 9: Verifisering av tungmetallkonsentrasjonar i agar utført på ICP-MS. Avvik (%) mellom utrekna verdi (mg/L) og målt verdi (mg/kg). ICP-MS metoden har ein måleusikkerhet på 40 %.

Metall	Rekna (mg/L)	Målt (mg/kg)	Avvik (%)
Cu 0,095 mM	6,0	6,1	+1,7 %
Cu 1,5 mM	95,3	100	+4,9 %
Cu 12 mM	762,5	860	+12,8 %
Zn 0,095 mM	6,1	8,1	+32,1 %
Zn 1,5 mM	98,1	110	+12,2 %
Zn 12 mM	784,6	1000	+27,5 %
Cd 0,095 mM	10,5	12	+13,9 %
Cd 0,75 mM	84,3	91	+7,9 %
Cd 3,0 mM	337,2	430	+27,5 %



Figur 12: Konsentrasjonar av tungmetalla koppar (Cu), sink (Zn) og kadmium (Cd) (mg/kg v.v.) i blåskjel frå 13 ulike lokalitetar. Stipla line visar PROREF [18] for skjel, Cu=1,42 mg/kg, Zn=17,7 mg/kg og Cd=0,18 mg/kg.

9 Kjelder

1. You, Y. and E.K. Silbergeld, *Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion*. *Frontiers in Microbiology*, 2014. **5**.
2. Bouki, C., D. Venieri, and E. Diamadopoulos, *Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: A review*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2013. **91**: p. 1-9.
3. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, *Antimicrobial resistance due to the use of biocides and heavy metals: a literature review*. VKM report, 2016. **63**.
4. Vitenskapskomiteen for mattrygghet, *The link between antimicrobial resistance and the content of potentially toxic metals in soil and fertilising products*. VKM report, 2017. **28**.
5. Tverrsektoriell ekspertgruppe, *Antibiotikaresistens - kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak*. 2014, Utgitt av Folkehelseinstituttet,.
6. Airas, S., A. Duinker, and K. Julshamn, *Copper, zinc, arsenic, cadmium, mercury, and lead in blue mussels (*Mytilus edulis*) in the Bergen harbor area, Western Norway*. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 2004. **73**(2): p. 276-284.
7. Miljødirektoratet. *miljøstatus.no Kart*. 2017 [cited 2017 01.04.]; Available from: <http://www.miljostatus.no/kart/>.
8. Mo, S.S., et al., *Antimicrobial resistance in the Norwegian environment - red fox as an indicator*, N.V. Institute, Editor. 2017, Norwegian Veterinary Institute: Commissioned by The Norwegian Environment Agency.
9. Kartverket. *Arealstatistikk for Norge*. 2017 [cited 2017 01.11]; Available from: <https://www.kartverket.no/Kunnskap/Fakta-om-Norge/Arealstatistikk/Arealstatistikk-Norge/>.
10. World Health Organization. *WHO list of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine (WHO CIA list)*. 2017; Available from: <http://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-fifth/en/>.
11. NORM/NORM-VET, *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway*. Tromsø/Oslo 2016. ISSN:1502-2307 (print)/1890-9965 (electronic). 2015.
12. Mangat, C.S., et al., *Characterization of VCC-1, a novel Ambler Class A carbapenemase from *Vibrio cholerae* isolated from imported retail shrimp sold in Canada*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016.
13. Duinker, A., et al., *Nasjonalt tilsynsprogram for produksjon av skjell og andre bløtdyr – prøver analyser i 2014: Kjemiske forurensende stoffer og mikroorganismer*, in *Report*, Nasjonalt Institutt for Ernæring og Sjømatforskning, Editor. 2015.
14. Matuschek, E., D. Brown, and G. Kahlmeter, *Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2014. **20**(4): p. O255-O266.
15. Magiorakos, A.P., et al., *Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance*. *Clinical Microbiology and Infection*, 2012. **18**(3): p. 268-281.
16. Resende, J.A., et al., *Multidrug-resistance and toxic metal tolerance of medically important bacteria isolated from an aquaculture system*. *Microbes and environments*, 2012. **27**(4): p. 449-455.
17. Svanevik, C.S. and B.T. Lunestad, *Introducing a Novel Media to Improve the Recovery of Culturable Bacteria from the Fish Parasite *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae)*. *Current Microbiology*, 2017. **74**(9): p. 1043-1048.
18. Miljødirektoratet, *Contaminants in coastal waters of Norway 2016*. 2017, Miljødirektoratet.
19. Molvær, J., et al., *Klassifisering av miljøkvalitet i fjorder og kystfarvann. Veiledning*. SFT. 97: 03. 1997, ISBN 82-7655-367.

20. EUCAST. *Clinical breakpoints - bacteria (v 7.1)*. 2017 [cited 2017 01.11]; Available from: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
21. Grevskott, D.H., et al., *Marine bivalve mollusks as possible indicators of multidrug-resistant Escherichia coli and other species of the Enterobacteriaceae family*. *Frontiers in Microbiology*, 2017. **8**(24).
22. NORM/NORM-VET, *Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø/Oslo 2016*. ISSN:1502-2307 (print)/1890-9965 (electronic). 2016.
23. Lunestad, B.T., et al., *Time trends in the prevalence of Escherichia coli and enterococci in bivalves harvested in Norway during 2007–2012*. *Food Control*, 2016. **60**: p. 289-295.
24. Yazdankhah, S., K. Rudi, and A. Bernhoft, *Zinc and copper in animal feed—development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin*. *Microbial ecology in health and disease*, 2014. **25**(1): p. 25862.
25. Hasman, H. and F.M. Aarestrup, *tcrB, a gene conferring transferable copper resistance in Enterococcus faecium: occurrence, transferability, and linkage to macrolide and glycopeptide resistance*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2002. **46**(5): p. 1410-1416.
26. Baker-Austin, C., et al., *Co-selection of antibiotic and metal resistance*. *Trends in Microbiology*, 2006. **14**(4): p. 176-182.
27. World Health Organization. *Global Priority List of Antibiotic-Resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. 2017 [cited 2017 01.04]; Available from: <http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/>.
28. Devarajan, N., et al., *Antibiotic resistant Pseudomonas spp. in the aquatic environment: A prevalence study under tropical and temperate climate conditions*. *Water Research*, 2017. **115**: p. 256-265.
29. Kwon, S.W., et al., *Pseudomonas koreensis sp. nov., Pseudomonas umsongensis sp. nov. and Pseudomonas jinjuensis sp. nov., novel species from farm soils in Korea*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003. **53**(1): p. 21-27.
30. Chang, Y.-T., et al., *Update on infections caused by Stenotrophomonas maltophilia with particular attention to resistance mechanisms and therapeutic options*. *Frontiers in Microbiology*, 2015. **6**: p. 893.
31. Crossman, L.C., et al., *The complete genome, comparative and functional analysis of Stenotrophomonas maltophilia reveals an organism heavily shielded by drug resistance determinants*. *Genome Biology*, 2008. **9**(4): p. R74.
32. Toleman, M.A., et al., *Global emergence of trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in Stenotrophomonas maltophilia mediated by acquisition of sul genes*. *Emerging Infectious Diseases*, 2007. **13**(4): p. 559.
33. Dietz, R., F. Riget, and P. Johansen, *Lead, cadmium, mercury and selenium in Greenland marine animals*. *Science of The Total Environment*, 1996. **186**(1): p. 67-93.
34. Statistisk sentralbyrå (SSB). *Befolkning og areal i tettsteder*. 2017 [cited 2017 01.11]; Available from: <https://www.ssb.no/befolkning/statistikker/befteft>.

Retur: Havforskningsinstituttet, Postboks 1870 Nordnes, NO-5817 Bergen

HAVFORSKNINGSINSTITUTTET
Institute of Marine Research

Nordnesgaten 50 – Postboks 1870 Nordnes
NO-5817 Bergen
Tlf.: +47 55 23 85 00
E-post: post@hi.no

www.hi.no

