
Utslipp av antibiotikaresistensgener med behandlet avløpsvann til resipienten

Av Carsten Ulrich Schwermer og Wolfgang Uhl

Carsten U. Schwermer (M.Sc.) er forsker i seksjonen Systemer og teknologi ved Norsk institutt for vannforskning (NIVA). Wolfgang Uhl (Ph.D., Professor) er forskningsleder ved NIVA og Prof. II ved NTNU, Institutt for Bygg og miljøteknologi.

Summary

Discharge of antimicrobial resistant genes in treated wastewater to recipients.

The abundance of selected marker genes for antimicrobial resistance (AMR) in water samples collected from the effluent of three Norwegian wastewater treatment plants was quantified. 16S rRNA, Int1 and Sul1 were the dominant antibiotic resistance genes (ARG) in the plant effluents. Equally high concentrations of most ARG that were measured in samples from all plants suggest that households and other diffusive sources play a dominant role as source for ARG in wastewater. The abundance of ARG seems to be independent of the treatment plant. At all plants, most of the ARG investigated are discharged to the recipient with the treated water. The presence of high ARG concentrations in samples collected from the recipient downstream of one of the plants was unexpected, and is explained by extraordinary circumstances in the section of the river where samples were collected. Conclusions on whether the treatment plant's effluents contribute more to the total load with anthropogenic ARG in the recipient than other diffusive sources cannot be drawn at the moment.

Sammendrag

Forekomsten av utvalgte markørgener for antimikrobiell resistens (AMR) i vannprøver tatt fra utslippet av tre norske avløpsrenseanlegg ble kvantifisert. 16S rRNA, Int1 og Sul1 er de tre dominerende antibiotikaresistensgenene (ARG) i utslippsvannet fra anleggene. Like høye konsentrasjoner av de fleste ARG som ble detektert i prøvene på alle anleggene antyder at husholdninger og andre diffuse kilder spiller en dominerende rolle som kilde for ARG i avløpsvannet. ARG forekomst virker å være uavhengig av renseanlegget. De fleste av de undersøkte ARG slippes ut til resipienten sammen med behandlet vann på alle anlegg. Uventede høye konsentrasjoner av de fleste undersøkte ARG i prøver tatt fra resipienten tilknyttet ett av anleggene forklares med særskilte forhold i delen av elven der prøvene ble tatt. For tiden er det umulig å konkludere om renseanleggets utslipp bidrar særlig mer til totalbelastningen med menneskeskapte ARG i elven enn andre diffuse kilder.

Introduksjon

Spredning av antimikrobiell resistens (AMR) er et alvorlig og globalt raskt voksende helseproblem. Sammenliknet med andre land er Norge fortsatt et lavprevalensland (HOD 2015; NORM/NORM-VET 2016). Likevel antyder nylige

studier (NORM/NORM-VET 2016; Jørgensen et al. 2017a; Jørgensen et al. 2017b) at bakterier også her i landet blir resistente mot både vanlig brukte antibiotika og kritisk viktige reserveantibiotika. Årsaker til spredningen av AMR forklares med overforbruk og feil bruk av antibiotika, import fra utlandet gjennom reisevirksomhet og kontaminert mat, samt spredning av antibiotikaresistente bakterier (ARB) i matproduksjonen (NORM/NORM-VET 2016).

Resistens i sykdomsfremkallende bakterier påvises i økende grad i det ytre miljøet som er påvirket av menneskeskapt forurensning, slik at resistensene ikke lengre er begrenset til helseinstitusjoner. Resistenser påvises blant annet i vann som i bekker, ved badestrender og i sjøen (Jørgensen et al. 2017a; Jørgensen et al. 2017b; Baars & Lambrecht 2018; Schwermer et al. 2018b). Siden resistens mot antibiotika forekommer naturlig i mange miljøbakterier (D'Costa et al. 2011), er det vanskelig å rekonstruere overføringsveiene av menneskeskapt AMR i miljøet, og å kvantifisere risikopotensialet for helse til mennesker og dyr. Nylige studier antyder en direkte sammenheng mellom ARB-forekomst i det akvatiske miljøet, kolonisering av ARB i tarmen av eksponerte mennesker, samt helseskader av disse personer (Søraas et al. 2013; Jørgensen et al. 2017b; Leonard et al. 2018).

Kommunale avløpsrensaneanlegg er kjent som viktige kilder for AMR-induserende faktorer, inklusive resistensdrivende stoffer (antibiotika, metaller, biocider), ARB og ARG (Rizzo et al. 2013). Det kompetitive miljøet i det biologiske trinnet på anleggene skapt gjennom kontinuerlig tilførsel av subterapeutiske konsentrasjoner av resistensdrivende stoffer fra ulike kilder, samtidig med høye bakteriekonsentrasjoner, kan føre til overføring av ARG fra kliniske bakterier til miljøbakterier, ARG-seleksjon, samt utvikling av nye ARB (Berendonk et al. 2015). Selv om konvensjonelle anlegg reduserer bakteriekonsentrasjoner betraktelig, viser studier (Schwermer et al. 2018a; Schwermer et al. 2018b) at anleggene ikke klarer å fjerne alle ARB, ARG og resistensdrivende stoffer fra avløpsvannet. Det er mulig at ARG i utslippet ville

kunne spres gjennom vertikal og horisontal genoverføring ut ifra rensaneanleggene i det naturlige mikrobielle samfunnet. Gjennom vann og mat kan AMR potensielt overføres fra miljøet til klinisk relevante bakterier og som kan utgjøre en helserisiko. Dette feltet er lite undersøkt i Norge, og det er behov for å generere mer kunnskap for vurderinger om innføring av tiltak.

De fleste avløpsrensaneanleggene slipper ut avløpsvann til vann som ofte brukes for rekreasjon, jordirrigasjon eller drikkevann. Dermed er det viktig å forstå hvor mye anleggene bidrar til forurensning i resipienten (vannforekomsten nedstrøms anlegget som mottar anleggets utslipp), og hvilken mikrobiologisk epidemiologisk påvirkning utgår fra disse forurensningene, inkludert skjebne til og intensitetsgraden av AMR. Dette krever en systematisk kartlegging av ARB og ARG både i avløpsanleggene og i den tilknyttete resipient. En kartlegging er videre motivert gjennom (i) usikkerhet i samfunnet med hensyn til helserisikoen utgående fra AMR-spredning; (ii) helse- og miljømyndighetenes behov for å risikovurdere situasjonen om spredning av AMR; (iii) evaluering fra offentlig side av muligheter til å iverksette tiltak i kampen mot spredning av AMR, og (iv) å sette strengere krav for desinfeksjon av resnet avløpsvann ved større avløpsanlegg. Hittil måles ikke AMR rutinemessig på rensaneanleggene i Norge eller i utlandet. Resipientundersøkelser m.h.t. kartlegging av AMR er enda sjeldnere, men myndigheter og ulike institusjoner har satt i gang ARG-overvåkningsprogrammer (Miljødirektoratet¹, NORMAN Network², NEREUS COST Action³, StARE-prosjektet⁴) og enklere målekampanjer (Baars & Lambrecht 2018). Per i dag mangler det en internasjonal harmonisering av eksisterende kvalitative og kvantitative AMR-analysemetoder.

¹ Miljødirektoratet (2018). Avtale om konsulentoppdrag - Kartlegging av antibiotikaresistens i akvatiske miljø.

² Network of reference laboratories, research centers and related organizations for monitoring of emerging environmental substances, <http://www.norman-network.net>

³ New and emerging challenges and opportunities in wastewater reuse (ES 1403), <http://www.nereus-cost.eu>

⁴ Water JPI Stopping antibiotic resistance revolution, <https://stareurope.wordpress.com>

Studiets mål var å kvantifisere utvalgte ARG og et integron (intI1) i prøver fra avløpsrenseanlegg og fra en resipient ved hjelp av kvantitativ real-time PCR (qPCR). Undersøkelsen ble gjennomført ved Nedre Romerike Avløpsselskap IKS (NRA) avløpsrenseanlegg på Strømmen, der behandlet avløpsvann slippes ut i resipienten Nitelva. For å undersøke skjebne til ARG i resipienten, ble prøvene tatt både fra renseanlegget (vannprøver) og i elven oppstrøms og nedstrøms nær utslippspunktet (vann- og biofilmprøver).

Denne studien er en utvidelse av en tidligere målekampanje (Schwermer *et al.* 2018b), da vi målte forekomst og fjerning av ARB og ARG fra avløpsvann på Vestfjorden Avløpsselskap (VEAS) og Bekkelaget Vann AS (BEVAS) avløpsrenseanlegg. For å se om det er forskjell mellom anleggene i forhold til forekomst av ARG i rensert vann, ble datamaterialet fra denne undersøkelsen inkludert her. Mens NRA og VEAS behandler avløp fra store sykehus, er den store forskjellen at BEVAS ikke tar imot noe sykehusavløp. Dessuten er rensekapasiteten (m.h.t. volumen) en forskjell, samt at det anvendes ulike biologiske behandlingsmetoder (Tabell 1). Alt dette kan ha en effekt på forekomst av AMR og ikke minst tolkningen av resultatene. Alle anleggene slipper ut til sårbare resipienter med brukerinteresser, dvs. Nitelva i falle av NRA og Indre Oslofjord i falle av VEAS og BEVAS.

Materiale og metoder

Avløpsrenseanlegg

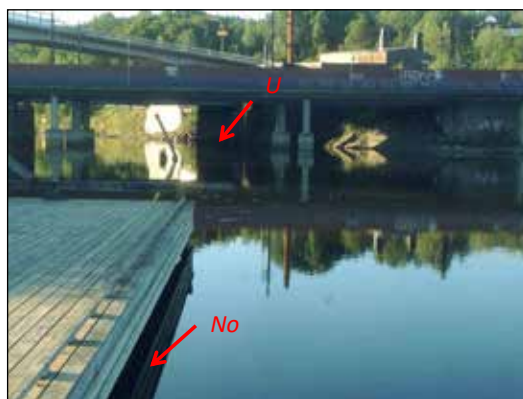
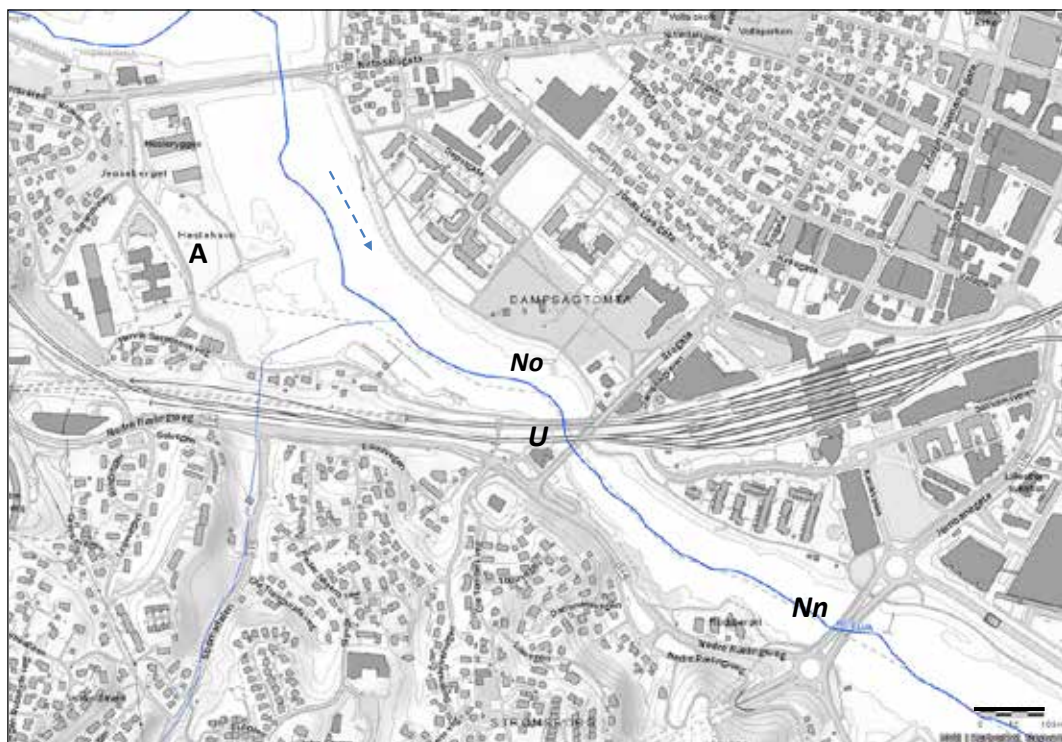
NRA avløpsrenseanlegget på Strømmen behandler avløpsvann fra 130.000 pe i Skedsmo, Lørenskog og Rælingen. I perioden 2014-2016 mottok renseanlegget gjennomsnittlig 18,7 millioner m³ avløpsvann årlig (Tabell 1). Av den totale råvannsvolum inn til anlegget gikk 0,57 millioner m³ (dvs. 3,1 %) i overløpet. Råvannet består av 80% avløp fra hushold og 20% avløp fra industri (% av COD). Råvannet passerer ris-ter og sand-/fettfangst, samt forsedimentering. Deretter behandles vannet i en MBBR- (*moving bed biofilm reactor*) prosess (kombinert før- og etter denitrifikasjon), der en karbonkilde tilsettes. Etter at vannet har passert ettersedimentering, der fellingskjemikalier (PAX) tilsettes, pumpes det behandlede vannet gjennom en 700 m lang tunnel og slippes ut (ca. 1.800 m³/t) i Nitelva under Rælingsbrua. Den hydrauliske retensjonstiden er 4 timer, hvorav 3 timer består av biologisk behandling. En detaljert prosessbeskrivelse av VEAS' og BEVAS' avløpsanlegg finnes i Schwermer *et al.* (2018a) og i Tabell 1.

Resipientbeskrivelse Nitelva

Nitelvas nedbørsfelt er totalt 486 km² og er preget mest av skog, noe jordbruk samt noe bebyggelse. Nitelva har Norges mest artsrike bestand av ferskvannsfisk. I den nedre delen ved Lillestrøm (Figur 1), før elven tømmer seg i Nordre

Tabell 1. Anleggenes behandlingsskapasitet, egenskaper samt andel estimert bidrag avløp fra sykehus på den årlige volumkapasitet av det tilknyttet renseanlegget (dvs. antall senger per m³ totalavløp fra renseanlegget).

Anlegg	Person-ekvivalenter (pe)	Kapasitet (million m ³ /år)	Bidrag til total avløp	Est. årlig bidrag av avløp fra sykehus (senger/m ³ totalavløp)	Biologisk prosess
VEAS	600.000	105	Urban, industri, sykehus (2100 senger) fra Oslo-Akershus	2,0 x 10 ⁻⁵	Biofilm (BIOFOR); fiksert-film for nitrifikasjon og denitrifikasjon
BEVAS	290.000	37	Urban (70%) og industri (30%) fra Oslo by	0	Aktivslam; denitrifikasjon, nitrifikasjon, denitrifikasjon
NRA	130.000	19	Urban (80%) og industri (20%), sykehus (664 senger) fra Skedsmo, Lørenskog og Rælingen	3,5 10 ⁻⁵	MBBR prosess; kombinert før- og etter denitrifikasjon



Figur 1. Prøvepunkter i Nitelva ved Lillestrøm oppstrøms (No) og nedstrøms (Nn) NRAs utslippspunkt (U). A = NRA avløpsreanseanlegg. Kartet: NVE, Kartverket (endret); Bilder: C. U. Schwermer

Øyeren sammen med Leira og Glomma, er Nitelva forurensset av fosfor, nitrogen, erosjonsmateriale og fekalbakterier, som fører til en moderat til dårlig økologisk vannkvalitet (Lindholm *et al.* 2011; DHI 2014; Holm *et al.* 2014; Person *et al.* 2015).

Vannføringskarakteristikk Nitelva

Elvens vannføring ble estimert ut ifra målinger av elvens vanddybden og flowhastigheten (bruk

av flåtemetode) på prøvetakingspunktet nedstrøms NRAs utslippspunkt (Nn) under Rælingsbrua samt under Lillestrømsbrua, og på første prøvetakingsdag (Tabell 2). En antatt friksjonsfaktor på 0,83 ble medberegnet. Beregningene våre er i samsvar med målinger fra en resipientmodell (DHI 2014), der det ble beregnet en vannføring på gjennomsnittlig 23.400 m³/t (med 3.240 m³/t på laveste og 184.000 m³/t på høyeste vannføring). Vannføringen for alle

Tabell 2. Estimerte karakteristikk av vannet i Nitelva ved prøvetaking.

Parameter	Målepunkt	Dato	Verdi
Utslipsrate rensed avløp fra NRA	Rælingsbrua	08.-10.09.2015	1.800 m ³ /t*
Prosent volum NRA avløp relatert til total vannføring i Nitelva		08.09.2015	5 %
		09.09.2015	12 %
	10.09.2015	17 %	
Vannføring Nitelva i m ³ /t	Lillestrømsbrua	08.09.2015	45.000 m ³ /t
		09.09.2015	24.000 m ³ /t
		10.09.2015	17.000 m ³ /t
Vannføring Nitelva i m/s	Lillestrømsbrua	08.09.2015	0,1 m/s
		09.09.2015	0,06 m/s
		10.09.2015	0,04 m/s

* gjennomsnittlig

Tabell 3. Beskrivelse av alle prøvetakingspunktene.

Prøvetakingspunkt	Koordinater	Lokasjon	Dato
VEAS utslipp	N59.79319 E10.49920	I anlegget før utslipp	15., 16., 17.10.2014
BEVAS utslipp	N59.88305 E10.77009		
NRA utslipp	N59.95438, E11.02525		
Nitelva oppstrøms (No) NRAs utslippspunkt	N59.95327, E11.03665	125 m oppstrøms NRAs utslipp, ved Dampsagtomta	08., 09., 10.09.2015
Nitelva nedstrøms (Nn) NRAs utslippspunkt	N59.94992, E11.04493	500 m nedstrøms NRAs utslipp, under Lillestrømsbrua	

andre dager ble bestemt gjennom en relasjon til Skedsmo kommunens vannstandsmålinger langs elven. Ved prøvetakingspunktet oppstrøms NRAs utslippspunkt (No) var vannet stillestående i løpet av de tre prøvetakingsdagene. Fortynningsgraden av avløpsvann fra NRA i Nitelva ble estimert ved å relatere et gitt utslippsvolumen fra NRA (konstant gjennomsnittlig 1800 m³/t i løpet av tre dager) til den beregnede vannføringen i elven.

Prøvetaking

Flowproporsjonale døgnblandingsprøver ble tatt over tre påfølgende dager i løpet av høsten 2014 og 2015 på alle rensanlegg med automatiserte prøvetakere før utslippet til resipient (Figur 1, Tabell 3). Stikkprøver fra Nitelva ble tatt ca. 500 m nedstrøms (på begge sider langs elven; «Nn» under Lillestrømsbrua) og 125 m

oppstrøms NRAs utslippspunkt til elva («No» ved Dampsagtomta) på de samme dagene som prøver fra NRA ble tatt. Biofilm ble skrapet fra begrodd stein fra elvebredden den 10. september, 2015 og 50 mg biofilm ble suspendert (10 min sterkt risting) i 100 mL ultra rent vann (MilliQ).

Molekylærbiologiske analyse

Vannprøver (0,1 eller 0,15 L) ble filtrert i triplikat gjennom polykarbonat membranfiltre (0,2 µm porestørrelse; Whatman), og DNA ble ekstrahert (PowerWater DNA Isolation Kit; MOBIO Laboratories Inc., Carlsbad, CA). DNA fra tre filtre ble samlet og utvalgte gener og integron intI1 vist i Tabell 4 ble kvantifisert med qPCR (Universal Master Mix M3003 fra New England BioLabs Inc.) ved Technische Universität Dresden, Institut für Hydrobiologie, i Tyskland.

Tabell 4. Gener brukt for qPCR-analysen. Gradering av relevans: 1 = persistent; 2 = prevalent; 3 = problematisk

Gen	Produkt	Resistensmål/ Funksjon	Relevans
16S rRNA	Ribosomale proteiner	---	2
bla _{TEM-10}	Bredspektrede β-laktamaser (ESBL) klasse A	Penicilliner	1
bla _{CTX-M-15}		β-laktamer: penicilliner og cefalosporiner ¹	3
bla _{CTX-M-32}			
bla _{KPC-3}	Karbapenem-hydroliserende klasse A β-laktamase	Karbapenem-antibiotika ² , penicilliner	3
bla _{OXA-48}	Karbapenem-hydroliserende klasse D β-laktamaser (oksacillinaser)		
bla _{OXA-58}			
int11	Integrase-gen av klasse 1 integroner, plattform for ulike resistensgener	Ulike antibiotika (aminoglycosider, trimetoprim, β-laktamer og erythromycin)	3
mcr-1	Phosphatidylethanolamin transferase	Polymyxiner, som colistin ¹	3
sul1	Dihydropteroat syntase	Sulfonamider	2
tetM	Tetracyclinresistent protein	Tetracyclin	2

¹ Reserveantibiotika (WHO 2017); ² WHO watch group antibiotika

Kvantifiseringsgrensene (LOQ) ble beregnet for hvert gen og ble relatert til prøvevolumet, deteksjonsgrensen og DNA mengde. Markørgener ble valgt ut med hensyn til persistens, prevalens i avløpsanlegg, risikopotensialet og fravær i urørt natur. Referanser for primere er ikke angitt, men kan angis ved etterspørsel.

Resultater og diskusjon

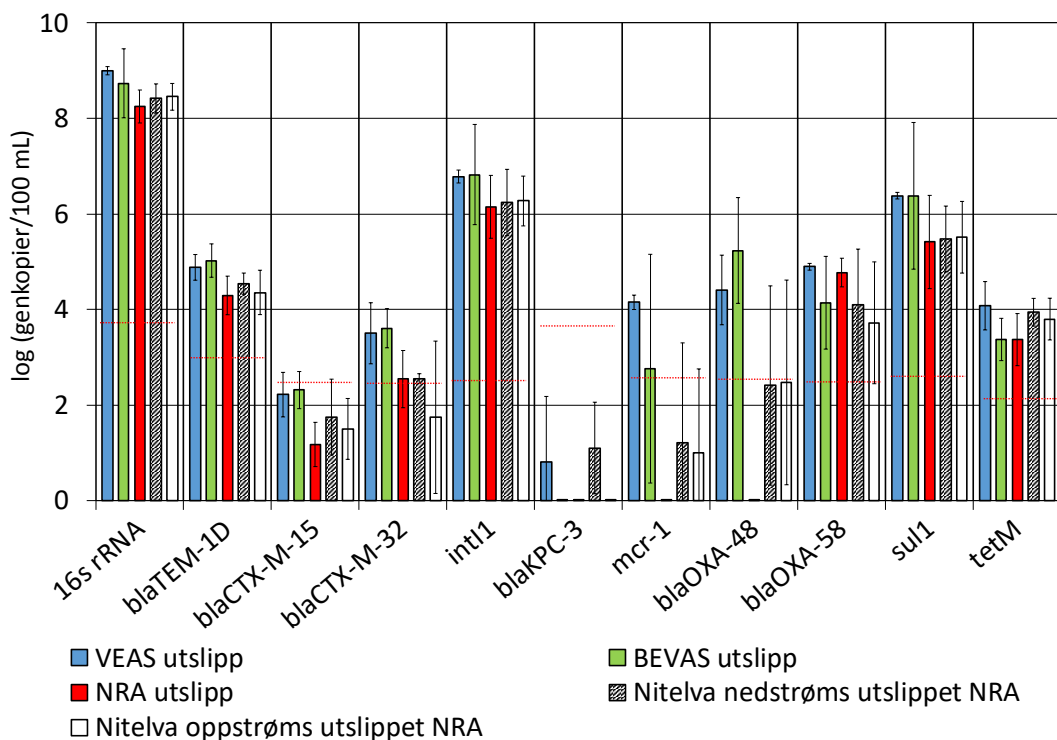
ARG i utslippsvann fra rensanleggene

Resultatene fra qPCR viser at 16S rRNA, Int11 og Sul1 er de tre dominerende genene i utslippsvannet på alle tre avløpsrensanleggene (Figur 2). Dette er i samsvar med funn av de samme genene i utslippsvann fra avløpsanlegg i Kypros, Portugal og Tyskland (Rocha et al. 2018). For de fleste av de undersøkte genene (unntatt MCR-1 og bla_{OXA-48}) lå konsentrasjonen på det samme nivået i alle tre anleggene. Dette impliserer at forekomsten av disse genene er uavhengig av type vannbehandlingsprosess. Men siden mcr-1 og bla_{OXA-48} ble detektert kun i prøver fra VEAS og BEVAS, derimot ikke fra NRA, er denne antagelsen usikker.

Når det gjelder NRA rensanlegget, siden ARG kun ble målt i prøver fra utløpet, men ikke i råvannet, mangler det informasjon om hvilke ARG har kommet inni anleggene og om vann-

behandlingen har påvirket genene. Genene som er påvist i utslippsprøvene har sannsynligvis enten overlevd behandlingen og passert anlegget, eller ARG ble overført mellom bakterier gjennom horisontal gentransfer i løpet av rensprosessen. Foruten vannbehandlingsprinsippet på anleggene kan flere andre faktorer bestemme forekomst og mengde av ARG i et avløpsanlegg. Disse er hovedsakelig (i) typer av kilder til AMR (andel avløp fra sykehus, industri, landbruk, diffus avløp); (ii) årstidsavhengige forhold og påvirkninger; (iii) mengde og kvalitet av overvannet; (iv) klimaet, og (v) samfunnets adferd (dvs. mønster av utslipp til kloakken) i forhold til utslipp av resistensdrivende stoffer, ARB og ARG.

Like høye konsentrasjonsnivåer av de fleste ARG i genspektret (vist i Figur 2) i prøver fra utslippet på alle tre anlegg – til tross for betydelig forskjell mellom anleggene i vannvolumet som behandles (Tabell 1) – antyder at husholdninger og andre diffuse kilder, men ikke nødvendigvis sykehus, spiller en stor rolle som kilde for AMR i avløpsvannet. Det er nemlig slik at mens BEVAS får ikke noe avløp fra sykehus, tar VEAS (2100 senger) og NRA (664 senger) imot relativt mye avløpsvann fra store sykehus i området. Dette resultatet bekreftes av en tidligere



Figur 2. Konsentrasjoner ARG, 16sRNA og *intI1* i prøver tatt fra utslippsvann ved VEAS, BEVAS og NRA, samt fra Nitelva nedstrøms og oppstrøms av NRAs utslippspunktet. Feillinjer viser standardavvik fra $n = 3$ målinger på tre etterfølgende døgn. Stipulerte røde linjer indikerer kvantifiseringsgrensen (LOQ) for hvert gen.

undersøkelse (Schwermer *et al.* 2018b), der AMR-dyrkning ble benyttet. Et enkelt estimat basert på antall senger på sykehus tilknyttet det aktuelle anlegget relatert til den kapasiteten av årlig behandlet volum totalavløpsvannet viser at det behandles et 1,8 ganger større volum avløpsvann fra sykehus ved NRA enn ved VEAS (Tabell 1). Hvis sykehusenes bidrag med ARG til avløpsvann på de undersøkte anleggene hadde vært stort, ville man forventet mye høyere ARG konsentrasjoner i utslipp fra NRA i forhold til VEAS. Dette var imidlertid ikke tilfellet. At sykehusene bidrar kun til generell frakt av resistensdrivende stoffer i avløpsvannet viser også andre studier (Kümmerer 2004; Thomas *et al.* 2007; EPA 2015).

Relativ høye konsentrasjoner av *sul1* og β -laktamase-genene *bla*_{TEM-1D}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58} og *bla*_{CTX-M-32} i utslippsvannet av anleggene, antyder resistens mot sulfonamider og β -laktam-

antibiotika. Dette funnet samsvarer med resultater fra dyrkning av ARB (Schwermer *et al.* 2018b), hvor en høy andel av *E. coli* viste resistens mot disse stoffgruppene. Dessuten viser kliniske studier (FUNL 2018) at 20–25 % av *E. coli*-isolater fra urin i Norge var resistente mot sulfonamider. Høy forekomst av genene *IntI1* og *bla*_{TEM-1D} samt *tetM* i prøvene gjenspeiler resistens mot penicilliner og tetracycliner, som er de mest brukte humanantibiotika i Norge.

IntI1, en klasse 1 integron-integrase-gen, fantes blant de mest dominerende genene i utslippsprøver fra alle tre anleggene. Integroner representerer molekulære markører for antropogene påvirkninger. Disse kan nemlig ta opp ulike gener (ofte resistensgener mot ulike antibiotika), fra miljøet som aktiveres når det er stressfaktorer til stede. Ifølge en tidligere undersøkelse (Gatica *et al.* 2016) av utslippsprøver fra VEAS var resistens mot aminoglykosider den

mest dominere IntI1-assosierte antibiotikaresistensmekanismen. Dette resultatet korrelerer med en studie der mange av såkalte extended spectrum betalactamase (ESBL)-produserende *E. coli*-isolater i prøver tatt fra VEAS utslipp og ved badestrender i Indre Oslofjord viste ervervet resistens mot aminoglykosider (Jørgensen *et al.* 2017b). Både konsum av og resistens mot aminoglykosider viser en økende tendens de siste årene, selv om aminoglykosidforbruket i Norge er relativt lite sammenliknet med andre humanantibiotika (NORM/NORM-VET 2015).

Relativt høye konsentrasjoner av karbapenemase OXA-58 i alle avløpsprøvene indikerer forekomst av karbapenemaser i anleggene. Dette gir resistens mot karbapenemer som er blant de viktigste reserveantibiotika (WHO 2017), og som kun skal brukes som siste utvei for pasienter med alvorlige infeksjoner. Ved VEAS og BEVAS ble det også funnet OXA-48, som sannsynligvis forekommer i *Enterobacteriaceae*, og som svært sjeldent forekommer i kliniske isolater i Norge. I løpet av de siste tiårene har antallet pasienter infisert med karbapenemase-produserende *Enterobacteriaceae* økt fra <5 til 37 tilfeller per år (NORM/NORM-VET 2016). For øvrig sprer genene bla_{OXA-48} og bla_{OXA-58} seg raskt over hele kloden (Bakthavatchalam *et al.* 2016).

I alle tre anleggene fantes genet bla_{TEM-1D} som hydrolyserer penicilliner i tillegg til genet bla_{CTX-M-32} for de bredspektrede β-laktamasene med aktivitet mot cefalosporiner. Dette antyder forekomst av resistens mot kritisk viktige penicillin β-laktamantibiotika og cefalosporiner. MCR-1, som koder mot colistin – et svært lite anvendt reserveantibiotika til human bruk i Norge mens brukt i store mengder i intensivt dyrehold i utlandet – ble funnet kun i utslippsvannet fra VEAS og BEVAS. Forekomst og relevans av colistinresistens, samt implikasjoner relatert til det, ble diskutert i detalj i Schwermer *et al.* (2018a). Resultatene våre impliserer at avløpsanlegg er en kilde til mcr-1, i tillegg til andre omtalte (Jørgensen *et al.* 2017a) kilder, som båttoaletter, dyrehold, jordbruk og trekkfugler.

Resultatene viser ingen forskjell mellom VEAS og BEVAS i forhold til mønstret av gen-

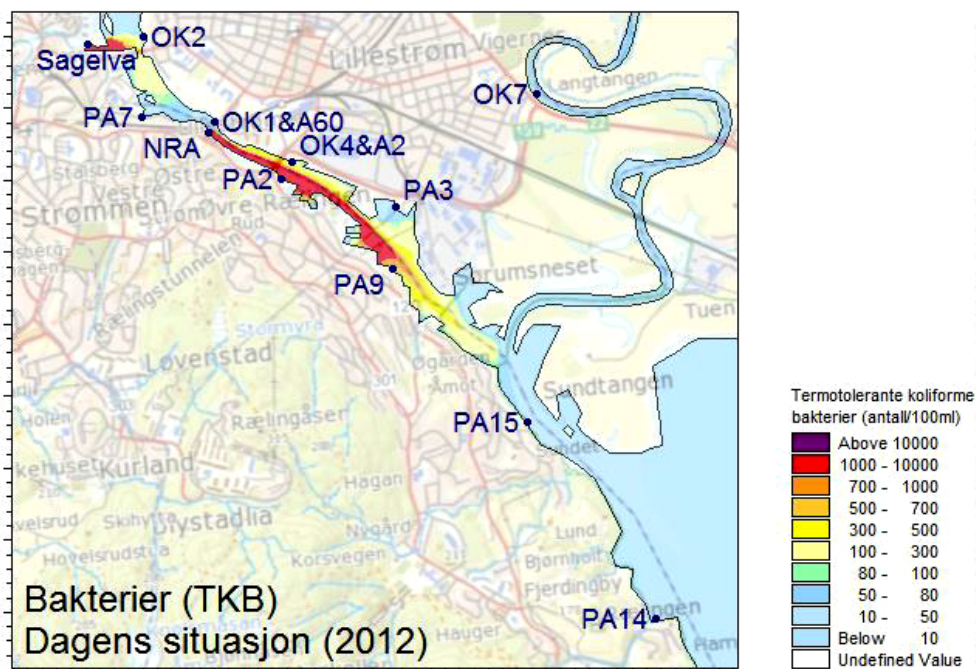
forekomst i prøver tatt i løpet av samme uken (høst 2014) (resultater ikke vist). I felle av prøver fra BEVAS og NRA, er mønstret av forekomst likt for de fleste genene og uavhengig årstid (basert på våre målinger i høst 2014 og våren 2015). Basert på et begrenset antall målinger betyr det at forekomsten av de undersøkte genene i utslippsvannet er sesong-uavhengig.

NRAs bidrag av ARG i Nitelva

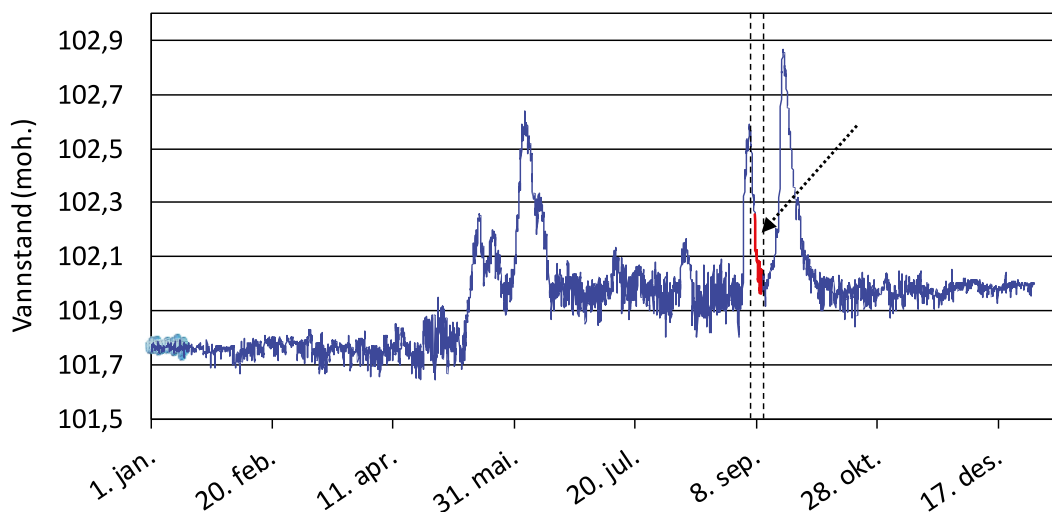
Vannprøvene tatt nedstrøms NRA-utslippspunktet (*Nn*) i Nitelva inneholdt samme konsentrasjoner av alle genene som ble målt i prøver fra NRAs utslipp (Figur 2). Ett unntak er bla_{OXA-48} som ble funnet kun i elveprøver. Forekomst av ARG ved prøvetakingspunkt *Nn* kan ikke nødvendigvis forklares med utslipp fra NRA, selv om NRA slipper ut høye konsentrasjoner koliforme bakterier og ARG (Figur 2; Figur 3) til elven, mest sannsynlig fordi desinfeksjon og fjerning av ARG i anlegget er ufullstendig (Schwermer *et al.* 2018b). Grunnen til det er at konsentrasjonsnivået av samtlige gener var like store oppstrøms NRAs utslippspunkt (*No*), dvs. ved kontrollpunktet, som det ble målt ved *Nn*.

Forklaringer for forekomst av like høye ARG-konsentrasjoner ved *No* og *Nn* omfatter:

- (i.) I delen der prøvene ble tatt er Nitelva sterkt forurenset av fekalbakterier (Figur 3). Tilførselen skjer gjennom bidrag fra Sagelva (ligger lengre oppstrøms), som har høye bakteriekonsentrasjoner (Figur 3) og svært dårlig vannkvalitet, samt fra tre gamle kommunale avløpsanlegg (Åneby, Rotnes og Slattum), spredt avløp og lekkasjer fra avløpsnett i områder lengre oppstrøms, i tillegg til urensset avløpsvann fra lokale overløp (NIVA/Bioforsk 2007; NRA 2017).
- (ii.) Vannstandsreguleringen i Øyeren påvirker nedre delen av Nitelva, slik at elven opptrer som elv ved lav vannstand og som innsjø ved høy vannstand i Øyeren. Dermed forventes at forurensinger transporteres periodevis fra Leira og Glomma, hvilke begge er sterkt forurenset med bakterier, næringsstoffer og partikler, selv



Figur 3. Resipientmodell med konsentrasjoner av termotolerante koliforme bakterier (TKB) i Nitelva oppstrøms og nedstrøms NRA sitt utslippspunkt (NRA) i 2012. Bildet tatt (med tillatelse) fra DHL, 2014.



Figur 4. Vannstand i Nitelva i løpet av 2015 målt under Lillestrømsbrua (Måler nr. POF6). Prøvetaksperioden er rød-markert. Data er fra Skedsmo kommune.

om de ligger langt unna. Dette har antakelig en sterk påvirkning, siden vannføringen kan variere mye (mellom 3.000 - 184.000 m³/t på laveste og høyeste vannføring).

(iii.) I perioder med sterkt nedbør og snøsmelting, når behandlingsskapiteten overstiges, slipper NRA ut urensset avløpsvann til elven via overløp (NRA 2017). Samtidig med (ii.) ville dette også påvirke

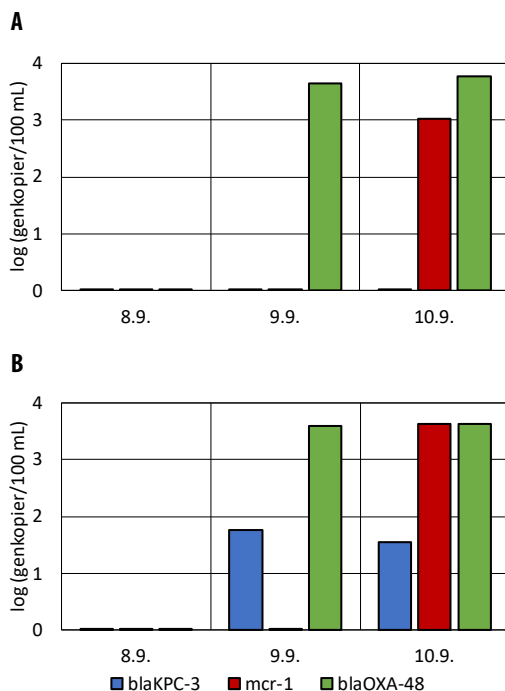
(dvs. å forurene med ARG) prøvetakingspunktet *No*.

- (iv.) Noen dager før prøvetakingskampagnen etter en periode med mye regn var det flom (Figur 4), som kan ha bidratt med betydelig forurensing fra overløte-avrenning ved *No*.

Genene bla_{OXA-48} og $mcr-1$ ble detektert i vannprøver fra elven (begge prøvepunkter *Nn* og *No*) samt i utslippet fra VEAS og BEVAS (Figur 2). Fravær av disse genene i utslippet fra NRA kan ha flere årsaker: Blant annet at genene enten ikke forekommer i råvannet, at de inaktiveres, fanges opp eller forandres i løpet av vannbehandlingen. Forekomsten av disse genene i elven kan derimot tyde på at ARG enten forekommer i elvevannet, at de stammer fra andre forurensningskilder, eller begge deler. Ved en nylig målekampanje i Tyskland fant man høye konsentrasjoner av $mcr-1$ og bla_{OXA-58} i prøver fra bekker nedstrøms et kommunalt avløpsanlegg og et sykehus (Baars & Lambrecht 2018). Det ble konkludert at disse er kildene til forurensing, selv om ingen kontrollprøver ble undersøkt for å bekrefte denne antakelsen. I likhet med vår studie fant man høye konsentrasjoner av bredspektrede β -laktamase (ESBL) genene bla_{TEM-1D} og $bla_{CTX-M-32}$ i disse vannkildene. Dette antyder at forekomsten av resistens mot disse antibiotika er mye mer utbredt i resipienter enn man ville anta.

Konsentrasjonene av de fleste genene i vannprøver tatt ved begge prøvetakingspunkter i elven i løpet av samme uke varierte relativt lite, som feillinjer i Figur 2 indikerer. Dette gjaldt imidlertid ikke for bla_{KPC3} , $mcr-1$ og bla_{OXA-48} , som ble detektert i lave konsentrasjoner da de var målbare på en eller to prøvetakingsdager (Figur 5).

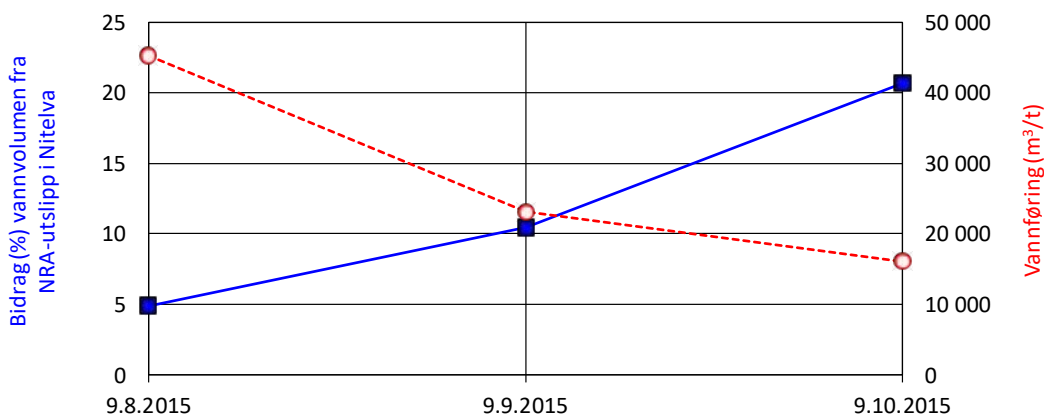
Genkonsentrasjonene i elven var uavhengig av elvens vannføring, som varierte mye i løpet av prøvetakingsperioden fra høy til lavere vannstand etter en flom noen dager før første prøvetakingen (Figur 4, Figur 6). Like høye genkonsentrasjoner ble målt på alle prøvetakingsdagene, selv om man kunne forventet en økning av ARG-



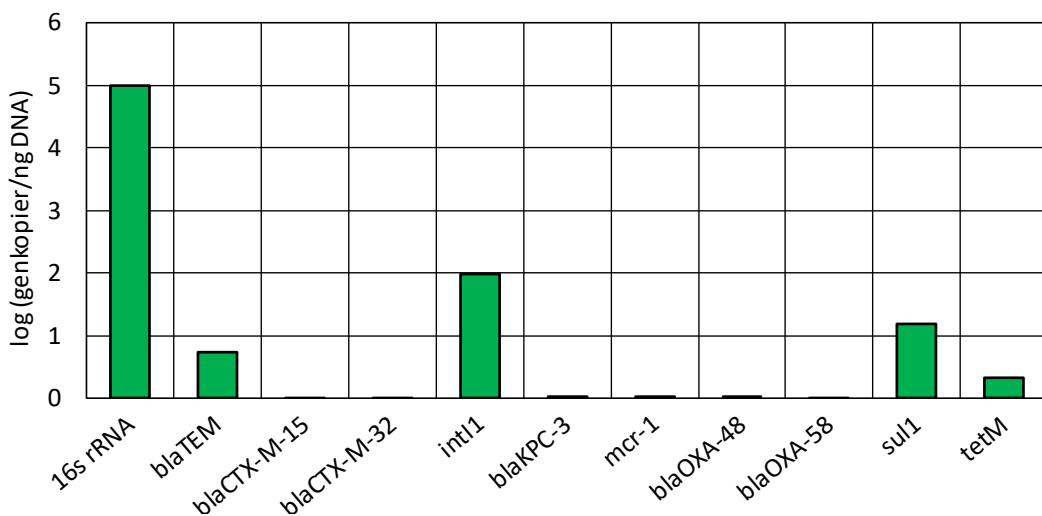
Figur 5. Forekomst av utvalgte kritiske lav-konsentrasjons ARG i prøver tatt på prøvetakingsdagene oppstrøms (A) og nedstrøms (B) NRAs utslippspunkt til Nitelva.

konsentrasjoner ved prøvepunktet *Nn* etter at andelen av vannvolum fra NRA-utslippet i elven økte fra 5 til 23 % som følge av minskning i elvens vannvolum (Figur 6), dvs. NRAs utslippet ble teoretisk mindre fortynnet. Dette impliserer at andre kilder til ARG i elven spiller en rolle, mens renseanlegget bidrar åpenbart kun til det generelle ARG-belastningen i elven. Uten flere systematiske målinger, også i andre lite forurensede resipienter, er det for tidlig å interpretare forskjellene relatert til variasjon i genforekomsten over tid.

For å finne ut om ARG akkumulerer over lang tid på begrodde overflater i elven, ble det tatt biofilmprøver fra elvens bunn nedstrøms NRAs utslippspunkt (*Nn*). Målingene av ARG-forekomsten i biofilmen gjenspeiler det samme mønstret av de dominerende genene, dvs. $16sRNA > intI1 > sul1 > bla_{TEM-1D} > tetM$ (i mengdemessig avtagende rekkefølge), som fantes i elvevannet (Figur 7). Konsentrasjonen av alle andre undersøkte genene var under



Figur 6. Estimert fortynningsgrad (blå; rektangel) av NRA-utslipp i Nitelva ved utslippspunktet (U), samt vannføring målt på prøvetakingspunkt Nn under Lillestrømsbrua (rød; sirkel).



Figur 7. Konsentrasjoner ARG i biofilm fra Nitelva nedstrøms NRAs utslippspunkt (n=1).

deteksjonsgrensen, enten fordi disse genene forekommer i lave konsentrasjoner slik at de ikke akkumulerer i biofilmen, at disse ikke tas opp i biofilmen, brytes ned (kjemisk eller biologisk), eller at de fraktes bort gjennom vannet.

Konklusjoner

Med hensyn til type og konsentrasjoner av ARG og int1 som ble målt i prøver av rensert utslippsvann, antyder resultatene at det ikke er store forskjeller mellom de tre undersøkte avløpsrenseanleggene. Herav var 16S rRNA, Int1 og Sul1 de

mengdemessig dominerende genene i utslippsvannet. Dette impliserer at husholdninger spiller en stor rolle som kilde for AMR i avløpsvannet, og at sykehus tilknyttet VEAS og NRA ikke nødvendigvis bidrar mer enn til generell forurensning i vannet med ARG som man også registrerer på BEVAS, som ikke er tilknyttet et sykehus. Videre impliserer resultatene at forekomst av ARG er uavhengig av type vannbehandlingsprosess og dermed uavhengig rensesanlegget. Men siden det er usikkert om andre faktorer ved siden av vannbehandlings-

prosessen påvirker forekomst av ARG, bør resultatene bekreftes gjennom mer detaljerte studier med hyppigere prøvetaking og over lengre tid.

Resultatene viser at alle anleggene slipper ut de fleste undersøkte ARG sammen med behandlet vann til resipientene, altså til Nitelva i falle av NRA og Indre Oslofjord i falle av VEAS og BEVAS. Uavhengig anlegget og dermed type vannbehandlingsprosess, viser utslippsprøvene høy forekomst av resistens mot penicilliner og tetracycliner, samt mot sulfonamider, trimetoprim, og aminoglykosider. I tillegg ble gener detektert som koder for resistens mot reserveantibiotika, inklusive karbapenemer, colistin (kun VEAS og BEVAS) og cefalosporiner.

Basert på resultater fra målinger av vann og biofilm i Nitelva, både nedstrøms og oppstrøms av NRAs utslippspunkt, kan man konkludere at det finnes høye konsentrasjoner av de fleste undersøkte ARG i elven. Dette resultat var uventede og overaskende. En plausibel forklaring for slik høye ARG-konsentrasjoner i elven, og særlig oppstrøms NRAs utslippspunkt, er særskilte forhold i Nitelva som var aktuell for prøvetakingspunktene før og i prøvetakingsperioden. Dette hovedsakelig på grunn av høy forurensning med fekalbakterier fra Sagselva (DHI 2014) og andre kilder lenge oppstrøms (lekkasje fra eldre avløpsanlegg oppstrøms, samt lokale overløp) (NIVA/Bioforsk 2007; NRA 2017), og muligens fra Glomma og Leira i forbindelse med vannstandsregulering av Øyeren, samt flom noen dager før prøvetaking (Figur 4). Det antas at disse diffuse kildene, sammen med variasjoner i både vannvolumet og strømningsretningen, fører til en «blanding av vannet» i nedre delen av elven som ble undersøkt, der Nitelva opptrer periodevis som innsjø, slik at vannkvaliteten på prøvetakingspunktet var lik.

Uten videre undersøkelser kan det dermed ikke konkluderes at NRA bidrar særlig mer til totalbelastningen i elven med ARG enn andre kilder. Det gjelder for øvrig også for VEAS og BEVAS, der det ennå ikke foreligger resipientmålinger fra Oslofjorden, selv om tidligere funn tyder på at begge anleggene slipper kontinuerlig

ut ARB og ARG til fjorden gjennom renset vann (Schwermer *et al.* 2018b). At store kommunale avløpsanlegg kanskje ikke er de største kildene til ARG i våre resipienter kan imidlertid ikke brukes som et argument for å ikke igangsette tiltak mot spredning av menneskeskapt AMR ut ifra anleggene.

Kun små forskjeller mellom utslipp av ARG fra menneskeskapt (dvs. gjennom avløpsrenseanleggene) og diffuse kilder viser hvor viktig er utvalget og bruken av ARG-markører, som ikke finnes i mikrobielle samfunnet til resipienten, og som kan brukes til kildeopsporing av ARG i resipienten. En risikovurdering med hensyn til spredning av ARB i Oslofjorden er for øvrig enda mer krevende enn for en elv som Nitelva. Dette på grunn av større kompleksitet og flere påvirkningsfaktorer i en fjord, som dybde, strøm, fortynning, vannkvalitet, bølger og vind.

Alle de undersøkte anleggene slipper ut ARG sammen med renset avløpsvann til økologisk sårbare resipienter som har et mangfold av ulike brukerinteresser. Det gjenstår å undersøke potensialet for den akutte helsefaren og langsiktige økologiske konsekvenser ut ifra ARB, ARG og resistensdrivende stoffer (som antibiotika) renselanleggene slipper ut. Den økende spredningen av de påviste ARG i det akvatiske miljø, som for øvrig registreres i hele verden, er bekymringsfullt, og skjer åpenbart også her i landet (selv om i mindre omfang), til tross for svært lite forbruk av reserveantibiotika. Denne trenden viser også andre ferske studier, som henviser til en direkte sammenheng mellom forekomst av AMR i det akvatiske miljøet - særlig i nærheten av utslippspunkter fra avløpsanlegg - og en resulterende negativ påvirkning av helsen til mennesker i området (Jørgensen *et al.* 2017a; Jørgensen *et al.* 2017b; Leonard *et al.* 2018).

Takksgelser

Forfatterne takker NRA, VEAS og BEVAS avløpsanlegg for prøvene og godt samarbeid. Skedsmo kommune takkes for vannføringsdata. Technische Universität Dresden, Institut für Hydrobiologie i Tyskland takkes for gjennom-

føring av qPCR-analysen. Marc Anglès d'Auriac (NIVA) takkes for konstruktivt råd ved qPCR-databearbeiding. Prosjektet ble gjennomført i forbindelse med COST Action ES1403 NEREUS programmet «New and emerging challenges and opportunities in wastewater reuse», som ble støttet av COST (European Cooperation in Science and Technology, www.cost.eu). Arbeidet ble støttet finansielt av NIVAs strategiske forskningsinitiativet SIS (NFR, kontrakt nr. 208430).

Referanser

Baars C. and Lambrecht O. (2018). Gefährliche Keime in Bächen, Flüssen und Seen. <https://www.ndr.de/nachrichten/niedersachsen/Gefaehrliche-Keime-in-Baechen-Fluessen-und-Seen,keime302.html> (besøkt 13/09/2018).

Berendonk T. U., Manaia C. M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Walsh F., Burgmann H., Sørum H., Norström M., Pons M. N., Kreuzinger N., Huovinen P., Stefani S., Schwartz T., Kisand V., Baquero F. and Martinez J. L. (2015). Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* 13(5), 310-317.

D'Costa V. M., King C. E., Kalan L., Morar M., Sung W. W. L., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R., Golding G. B., Poinar H. N. and Wright G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477, 457-461.

DHI (2014). NRA Resipientmodellering - Numerisk modellering av fosfor og bakteriologisk belastning i Nitelva, Leira, Svellet, Glomma og Øyeren. DHI AS, Trondheim.

EPA (2015). Hospital effluent: impact on the microbial environment and risk to human health. Environmental Protection Agency, Wexford, Ireland. Report nr. 162. ISBN: 978-1-84095-614-6.

FUNL (2018). Norsk legemiddelhåndbok. Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok. <http://legemiddelhandboka.no> (besøkt 13/09/2018).

Gatica J., Tripathi V., Green S., Manaia C. M., Berendonk T., Cacace D., Merlin C., Kreuzinger N., Schwartz T., Fatta-Kassinos D., Rizzo L., Schwermer C. U., Garelick H., Jurkevitch E. and Cytryn E. (2016). High Throughput Analysis of Integron Gene Cassettes in Wastewater Environments. *Environ Sci Technol* 50(21), 11825-36.

HOD (2015). Nasjonal strategi mot Antibiotikaresistens 2015–2020. Helse- og omsorgsdepartementet, Oslo, Norge.

Holm T. M., Chiarello C. M., de Ruiter H. and Aakerøy P. (2014). Årsrapport 2013 Kjemisk fysisk overvåkning av vannforekomster i vannområde Leira-Nittelva. Rambøll.

Jørgensen S. B., Søraas A., Arnesen L. S., Leegaard T., Sundsfjord A. and Jenum P. A. (2017a). First environmental sample containing plasmid-mediated colistin-resistant ESBL-producing *Escherichia coli* detected in Norway. *APMIS* 125(9), 822-5.

Jørgensen S. B., Søraas A. V., Arnesen L. S., Leegaard T. M., Sundsfjord A. and Jenum P. A. (2017b). A comparison of extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* from clinical, recreational water and wastewater samples associated in time and location. *Plos One* 12(10), 1-15.

Kümmerer K. (2004). Resistance in the environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 54(2), 311-20.

Leonard A. F. C., Zhang L., Balfour A. J., Garside R., Hawkey P. M., Murray A. K., Ukoumunne O. C. and Gaze W. H. (2018). Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environment International* 114, 326-33.

Lindholm M., Haaland S. and Gjemlestad L. J. (2011). Overvåking av vassdrag på Romerike 2010 og samlet vurdering av økologisk tilstand for perioden 2008-2010. NIVA/Biofosk, rapport nr. 6121-2011.

NIVA/Bioforsk (2007). Tiltaksanalyse Nitelva. NIVA & Bioforsk, rapport nr. 5453-2007.

NORM/NORM-VET (2015). Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø / Oslo 2016. ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).

NORM/NORM-VET (2016). NORM/NORM-VET 2016. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. Tromsø / Oslo 2017. ISSN:1502-2307 (print) / 1890-9965 (electronic).

NRA (2017). Hovedplan for avløp 2018 – 2033. Nedre Romerike Avløpselskap IKS, Skedsmo.

Person J., Fosholt Moe T., Edvardsen H. and Friberg N. (2015). Biologisk overvåking i Vannområde Leira-Nitelva 2014. NIVA, rapport nr. 6816-2015.

Rizzo L., Manaia C., Merlin C., Schwartz T., Dagot C., Ploy M. C., Michael I. and Fatta-Kassinos D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. *Science of the Total Environment* 447, 345-60.

Rocha J., Cacace D., Kampouris I., Guilloteau H., Jäger T., Marano R. B. M., Karaolia P., Manaia C. M., Merlin C., Fatta-Kassinos D., Cytryn E., Berendonk T. U. and Schwartz T. (2018). Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. *Journal of Environmental Chemical Engineering*; in press. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.022>.

Schwermer C. U., Krzeminski P., Wennberg A. C., Vogel-sang C. and Uhl W. (2018a). Removal of antibiotic resistant *E. coli* in two Norwegian wastewater treatment plants and by nano- and ultrafiltration processes. *Water Science and Technology* 77(4), 1115-26.

Schwermer C. U., Krzeminski P. K. and Uhl W. (2018b). Forekomst av antibiotikaresistensgener og fjerning av antibiotikaresistente *E. coli* i to norske avløpsrens-anlegg. *Vann* 53, 192-204.

Søraas A., Sundsfjord A., Sandven I., Brunborg C. and Jenum P. A. (2013). Risk factors for community-acquired urinary tract infections caused by ESBL-producing enterobacteriaceae-a case-control study in a low prevalence country. *Plos One* 8(7).

Thomas K. V., Langford K. H., Grung M., Schlabach M. and Dye C. (2007). Occurrence of selected pharmaceuticals in wastewater effluents from hospitals (Ullevål and Rikshospitalet) and VEAS wastewater treatment works (TA-2246/2007). Norwegian Environment Agency, Oslo, Norway.

WHO (2017). WHO Model List of Essential Medicines 20th list. World Health Organization.