

Bacheloroppgave

MB301612 Bacheloroppgave Bioteknologi
Forekomst av antibiotikaresistens hos marine
bakterier i Borgundfjorden.

Kandidatnummer: 2210 og 2206

Totalt antall sider inkludert forsiden: 93

Innlevert Ålesund, 29.05.2015

Obligatorisk egenerklæring/gruppeerklæring

Den enkelte student er selv ansvarlig for å sette seg inn i hva som er lovlige hjelpemidler, retningslinjer for bruk av disse og regler om kildebruk. Erklæringen skal bevisstgjøre studentene på deres ansvar og hvilke konsekvenser fusk kan medføre. **Manglende erklæring fritar ikke studentene fra sitt ansvar.**

Du/ dere fyller ut erklæringen ved å klikke i ruten til høyre for den enkelte del 1-6:		
1.	Jeg/vi erklærer herved at min/vår besvarelse er mitt/vårt eget arbeid, og at jeg/vi ikke har brukt andre kilder eller har mottatt annen hjelp enn det som er nevnt i besvarelsen.	<input checked="" type="checkbox"/>
2.	Jeg/vi erklærer videre at denne besvarelsen: <ul style="list-style-type: none">• ikke har vært brukt til annen eksamen ved annen avdeling/universitet/høgskole innenlands eller utenlands.• ikke refererer til andres arbeid uten at det er oppgitt.• ikke refererer til eget tidligere arbeid uten at det er oppgitt.• har alle referansene oppgitt i litteraturlisten.• ikke er en kopi, duplikat eller avskrift av andres arbeid eller besvarelse.	<input checked="" type="checkbox"/>
3.	Jeg/vi er kjent med at brudd på ovennevnte er å <u>betrakte som fusk</u> og kan medføre annullering av eksamen og utestengelse fra universiteter og høgskoler i Norge, jf. Universitets- og høgskoleloven §§4-7 og 4-8 og Forskrift om eksamen §§30 og 31.	<input checked="" type="checkbox"/>
4.	Jeg/vi er kjent med at alle innleverte oppgaver kan bli plagiatkontrollert i Ephorus, se Retningslinjer for elektronisk innlevering og publisering av studiepoenggivende studentoppgaver	<input checked="" type="checkbox"/>
5.	Jeg/vi er kjent med at høgskolen vil behandle alle saker hvor det forligger mistanke om fusk etter høgskolens studieforskrift §30	<input checked="" type="checkbox"/>
6.	Jeg/vi har satt oss inn i regler og retningslinjer i bruk av kilder og referanser på biblioteket sine nettsider	<input checked="" type="checkbox"/>

Publiseringsavtale

Studiepoeng: 22.5

Veileder: Sahar Olsen, Ann-Kristin Tveten og Gro A. Hagen

Fullmakt til elektronisk publisering av oppgaven

Forfatter(ne) har opphavsrett til oppgaven. Det betyr blant annet enerett til å gjøre verket tilgjengelig for allmennheten ([Åndsverkloven §2](#)).

Alle oppgaver som fyller kriteriene vil bli registrert og publisert i Brage HiÅ med forfatter(ne)s godkjennelse.

Oppgaver som er unntatt offentlighet eller båndlagt vil ikke bli publisert.

Jeg/vi gir herved Høgskolen i Ålesund en vederlagsfri rett til å gjøre oppgaven tilgjengelig for elektronisk publisering:

ja nei

Er oppgaven båndlagt (konfidensiell)?

ja nei

(Båndleggingsavtale må fylles ut)

- Hvis ja:

Kan oppgaven publiseres når båndleggingsperioden er over?

ja nei

Er oppgaven unntatt offentlighet?

ja nei

(inneholder taushetsbelagt informasjon. [Jfr. Offl. §13](#)/[Fvl. §13](#))

Dato:

Antall ord: 12,964

Sammendrag

Denne studien tar for seg antibiotikapåvirkning og resistensutvikling hos marine bakterier ved sykehus utslipp. Prøver ble tatt fra et område nært renseanlegget og sammenlignet med prøver fra to referanseområder (områder uten samme påvirkning). Det ble testet for følgende antibiotika typer: Penicillin G, Cefalotin, Doksisyklin, Trimetoprim-sulfametoksazol og Ciprofloksacin. Prøvene som viste resistens ble valgt ut til 16S rRNA amplifisering og sekvensert. Det var tydelig forskjell mellom målområdet og referanseområdene, da det var mer resistens på målområdet. Forskjellen var mest tydelig for penicillin G og cefalotin, men viste forskjell for alle de testede antibiotika typene. Bakteriene med resistens ble identifisert som marine bakterier, for det meste innenfor γ -proteobacteria genuset. Det er sannsynlig at utslippet fra sykehuset forårsaker forskjellen i resistens mellom mål- og referanseområdene. Denne forskjellen er sannsynligvis forårsaket av en kombinasjon av naturlig og påvirket resistens.

Forord

Bacheloroppgaven er skrevet ved Høgskolen i Ålesund som en avslutning på bachelor graden i bioteknologi. Vi har gjennom disse 3 årene lært utrolig mye som vi har hatt bruk for i denne oppgaven, og som vi vil ha stor nytte av i senere utdanning og arbeid. Vi har møtt vanskeligheter på veien, men med hardt arbeid, lidenskap og dyktige veiledere har vi kommet oss i mål.

Vi vil gjerne takke våre veiledere; Sahar Olsen, Ann-Kristin Tveten og Gro A. Hagen.

Vi vil også takke alle som har vært en del av oppgaven:

Kristin Bjørdal har hjulpet oss mye med medie og dyrkning av bakterier.

Synnøve H. Almås har gitt oss kunnskap om resistensbestemmelse.

Heidi Engstrøm for svar på tilfeldige spørsmål og utholdenhet med døråpning på kjemikalierommet.

Driftsleder Joar Strand for nyttig informasjon om Åse renseanlegg.

Vi vil også takke samboer og ektemann Stelios og Magne som har støttet oss og gitt oss en klapp på skulderen om nødvendig. Takk også til Marianne som er flink i rettskriving, og Grete som har vært en flott barnevakt.

Innhold

Sammendrag	4
Forord	5
1. Innledning	8
1.1 Presentasjon av tema.....	8
1.2 Problemstilling.....	8
1.2.1 Bakgrunn for valg av problemstilling.....	8
1.2.2 Hvorfor er problemstillingen relevant for vår utdanning?.....	9
1.3 Begrunnelse for avgrensning av oppgaven.....	9
1.4 Oppgavens oppbygging.....	9
2. Teori	13
2.1 Antibiotika.....	13
2.2 De testede antibiotika.....	14
2.2.1 Ciprofloksacin.....	14
2.2.2 Doksysykin.....	15
2.2.3 Trimetoprim/Sulfametoksazol.....	15
2.2.4 Penicillin G (Benzylpenicillin).....	16
2.2.5 Cefalotin.....	17
2.3 Avløpsrensing.....	17
2.3.1 Åse renseanlegg.....	19
2.3.2 Effekt av rensing.....	19
2.4 Antibiotikaresistens.....	20
2.4.1 Hva er antibiotika resistens?.....	20
2.4.2 Utvikling av antibiotika resistens.....	21
2.4.3 Spredning av resistens fra kloakk.....	23
2.4.4 Resistensforhold i Norge.....	24
2.4.5 Konsekvenser av antibiotikaresistens.....	25
2.5 Miljø.....	26
2.5.1 Habitat.....	26
2.5.2 Marine bakterier.....	27
2.4.4 Tarmbakterier og andre vanlige patogene bakterier i utslipp.....	28
2.5.4 Overlevelse av avløpsbakterier i sjøvann.....	28
2.6 Eksempler på noen bakterier.....	29
2.6.1 Pseudoalteromonas sp.....	29
2.6.1.1 Noen arter innenfor genuset <i>Pseudoalteromonas</i> og deres følsomhet mot antibiotika.....	29
2.6.2 Pseudomonas fluorescens.....	31
2.6.3 Psychromonas arctica.....	31
2.6.4 Colwellia aestuarii.....	32
2.6.5 Flavobacterium frigidarium.....	32
3. Material og Metode	33
3.1 Valg av metoder.....	33
3.2 Prøvetakning og dyrkning.....	35
3.2.1 Forberedelser.....	35
3.2.2 Prøvetakning.....	38

3.2.3 Dyrkning på agar plater.....	42
3.2.4 Dyrkning av renkulturer.....	43
3.3 Testing av antibiotikaresistens (agar diffusjonstest).....	44
3.4 DNA isolering.....	45
3.5 Amplifisering av mål gen (16S rRNA).....	46
3.5.1 Elektroforese.....	47
3.6 Rensing av PCR produkt.....	48
3.7 Sekvenseringsreaksjon.....	48
3.8 Genetisk analyse.....	49
4. Resultat.....	51
4.1 Resultat fra disk diffusjon test.....	51
4.2 Elektroforese.....	54
4.3 Genetisk analyse.....	55
5. Diskusjon.....	58
5.1 Påviste bakterier.....	58
5.1.2 Mangfold.....	59
5.2 Amplifiserings reaksjon.....	59
5.3 Resistensbestemmelse.....	59
5.4 Sammenligning av resultat fra tidligere oppgave.....	62
5.5 Konsekvenser.....	62
6. Konklusjon.....	64
7. Referanser.....	65
Vedlegg 1.....	68
Vedlegg 2.....	71
Vedlegg 3.....	73
Vedlegg 4.....	75
Vedlegg 5.....	78
Vedlegg 6.....	81
Vedlegg 7.....	85
Vedlegg 8.....	87
Vedlegg 9.....	88

1. Innledning

1.1 Presentasjon av tema

Antibiotikaresistens er et kontroversielt tema som har vært mye omdiskutert i media og som har fått mer og mer oppmerksomhet med tanke på konsekvensene. Det er derfor blitt utført en del forskning og overvåkning rundt temaet i nyere tid. Vi fant derfor dette temaet svært interessant og ønsket å jobbe videre med det. Vi fikk også benytte mye av det vi har lært i løpet av utdannelsen. I tillegg til at vi fikk nye utfordringer der vi har måttet tilegne oss ny kunnskap.

Denne bacheloroppgaven bygger på en tidligere bacheloroppgave, "Resistensutvikling hos marine bakterier i Borgundfjorden", som tar for seg påvirkning av marine bakterier i miljøet på grunn av antibiotika i utslipp ved Åse renseanlegg. Dette renseanlegget tar også mot utslipp fra Ålesund sykehus, noe som gir mulighet for større andel antibiotika rester og resistente bakterier i utslippet, enn ved et vanlig renseanlegg (1 s.143).

1.2 Problemstilling

Vi har valgt problemstillingen "Kan det påvises større forekomst av antibiotikaresistens hos marine bakterier ved Åse renseanlegg?".

Formålet med bacheloroppgaven vår er å undersøke om det er større forekomst av antibiotikaresistens hos bakterier fra utslippsområdet ved Åse renseanlegg, og kartlegge disse.

1.2.1 Bakgrunn for valg av problemstilling

Antibiotikaresistens er et økende nasjonalt og internasjonalt problem som fører med seg alvorlige konsekvenser. Det er derfor viktig å begrense/bremse denne utviklingen (2, 3). Da utviklingen av nye antibiotika har stagnert (4), er det desto viktigere å ta vare på de

antibakterielle midlene vi har, da disse er verdifulle legemiddel som bør benyttes på en slik måte at minst mulig resistens utvikles (4). Det er derfor viktig å kartlegge antibiotikaresistens hos marine bakterier for å undersøke hvordan sykehus utslipp påvirker disse, med tanke på resistensutvikling og spredning av resistens.

1.2.2 Hvorfor er problemstillingen relevant for vår utdanning?

Denne problemstillingen er svært relevant for vår utdanning da den bygger på mange av fagene i studiet: generell mikrobiologi, mikrobiell økologi, grunnleggende kjemi, organisk kjemi og biokjemi, bioinformatikk, anvendt bioteknologi og spesielt "spesial emner i bioteknologi". I spesial emner i bioteknologi tok vi for oss temaet antibiotika resistens. Dette har gitt oss et godt grunnlag for å arbeide med temaet antibiotikaresistens. Vi har også benyttet mange bioteknologiske teknikker i denne studien.

1.3 Begrunnelse for avgrensning av oppgaven

Siden vi valgte å bygge på en tidligere oppgave, førte dette med seg en del begrensninger. For å kunne sammenligne våre resultater med deres, måtte vi benytte samme dyrkingsmedium, antibiotika typer og antibiotika test (disk diffusjons test). Vi kunne også ha tenkt oss å sekvensere flere prøver for å få mer å sammenligne målområde og referanseområdene med, men vi måtte holde budsjettet vårt. Tiden vi hadde til rådighet var vår semesteret, sånn omtrent 5 måneder.

1.4 Oppgavens oppbygging

For å løse problemstillingen vår har vi i tillegg til å dyrke og antibiotika teste marine bakterier fra Åse, Alnes og Flø, fått sekvensert 16S rRNA genet fra disse bakteriene. Dette for å kunne identifisere bakterieart, for så å sammenligne med det som er kjent av resistens profil for disse bakteriene. I tillegg gir identifisering oss muligheten til å se på bakteriemangfoldet på de ulike områdene. Ved naturlig resistens vil de bakterie artene som

har denne fordelene selekteres mens de andre dør (3). Sammenligning av bakteriemangfoldet mellom referanseområdene og målområdet vil da kunne si oss noe om dette. I slutten av innledningen er det lagt med en tabell (tabell 1) som forklarer faguttrykk som er benyttet i oppgaven. Teoridelen tar for seg relevant informasjon om antibiotika, antibiotikaresistens, avløpsrensing, marint miljø samt hvilke bakterier vi forventer å finne. Det finnes ikke noe fasitsvar på resistensbestemmelse hos mange av de marine bakteriene. Vi har derfor tatt med noe teori om de identifiserte bakteriene og deres resistensprofil dersom denne er kjent. I metodedelen er fremgangsmåten satt opp systematisk og detaljert etter hva som er blitt gjort. Resultatdelen inneholder relevant resultat fra metodedelen i systematisk rekkefølge. I diskusjonen har vi drøftet gjennomføring av oppgaven og resultat opp mot teorien og problemstillingen. Vi har også sammenlignet resultatet vårt med resultatet fra den tidligere bacheloroppgaven og diskutert eventuelle konsekvenser av resistens. Oppgaven avsluttes med en kort konklusjon, der vi tar for oss det vi har kommet frem til i dette forsøket, og forslag til videre forskning på temaet nevnes.

Tabell 1 Forklaring på faguttrykk og forkortelser i teksten.

Forklaring på faguttrykk og forkortelser i teksten.			
Abiotiske faktorer	Kjemiske og fysiske forhold. Ikke levende del av et økosystem.	Genus	Latinsk betegnelse for slekt i den systematiske inndeling.
Aerob	(Bakterie) må ha eller kan ha oksygen tilstede for å vokse og leve. (Forhold) oksygen tilstede.	Habitat	Levested for organisme.
Afotisk sone	Sone i havet der det er for lite lys til fotosyntese.	Heterotrofe	Organisme med organisk karbonkilde som eneste karbonkilde (kan ikke fikse in organisk karbon).
Anaerob	(Bakterie) må ha eller kan ha forhold uten oksygen for å vokse og leve. (Forhold) uten oksygen tilstede.	Hydrofob	Betegnelse på stoffer som er vann avvisende, de er vanligvis nærmest uløselige i vann.

Anoksisk	Anoksiske forhold er forhold der oksygen ikke er tilstede.	Hydrolyse	Hydrolyse, opptak av et vannmolekyl i et molekyl som deretter spaltes til to molekyler.
Antibiotika profylakse	Bruk av antibiotika for å forebygge infeksjonskomplikasjoner etter kirurgi.	Hydrostatisk trykk	Trykket et sted i en veske som er i ro.
Autotrof	Organisme som utvinner energi fra sollyset.	Kjemoheterotrofe	Organismer med organisk karbonkilde (kan ikke fikserer in organisk karbon), og har organiske /uorganiske forbindelser som energi kilde.
Baktericid	Bakterie drepende.	MIC	Minimal inhibitory concentration, minste veksthemmende konsentrasjon (målt i mg/l).
Bakteriostatisk	Hemmer bakterievekst.	MRSA	Meticillinresistente Staphylococcus aureus.
Betalaktamaser	Enzymer som inaktiverer betalaktamer.	Neuston	Luft/vann fasen.
Biotiske faktorer	Biologiske forhold. Den levende delen av et økosystem.	Obligat aerob	Må ha oksygen for å leve og vokse.
Cytotoksisk	Cellegiftig.	Opportunistisk patogen	Mikroorganisme som normalt ikke gir sykdom, bare ved nedsatt immunforsvar.
Di hydrofolatreduktase	Enzym i bakterienes folinsyresyntese.	PBP	Penicillinbindende proteiner. Målmolekyler for alle betalaktamantibiotika.
Di hydropteroat syntase (DHPS)	Enzym i bakterienes folinsyresyntese.	Psykrofil	Organismer som vokser ved lave temperaturer.
DNA-gyrase	Enzym i forbindelse med DNA replikasjon.	R plasmid	Plasmid med resistens gen.
Effluks	Utpumping	Salinitet	Salt innhold.
Ekstra kromosomale elementer.	Plasmider.	Topoisomerase IV	Enzym i forbindelse med bakteriers DNA replikasjon.
Eufotisk sone	Sone i havet der lyset trenger ned.	VNC	Viable but nonculturable. Levedyktig men ikke

			dyrkbare.
Fenotype	Observerte egenskaper, utrykte gen.	VRE	Vankomycinresistente enterokokker.
Fotodegradering	Degradering (reaksjon) forårsaket av lys.	Økoskygge	Påvirkning av den økologiske balansen både i normalfloraen og i miljøet. Bredspektrede middel som kommer langt bort fra målområdet (infeksjonsstedet) har stor økoskygge, mens et smalspektert som konsentreres på målområdet har liten økoskygge.
Fylogenetisk	Slektskapsforhold mellom arter.	16rRNA	Navn på et gen.
Genotype	Arveanlegg, gener.		

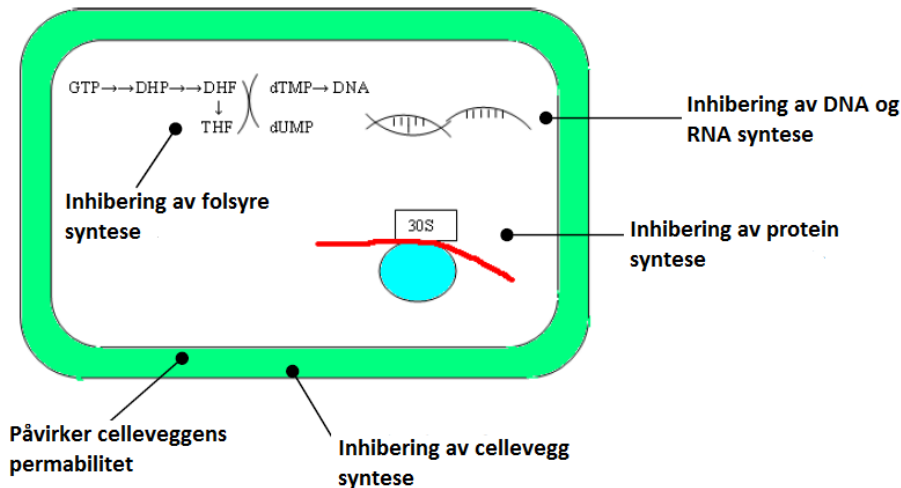
2. Teori

2.1 Antibiotika

Selman Waksman beskrev i 1941 et antibiotikum som en kjemisk substans, som er produsert av en mikroorganisme, og har evnen til å inhibere vekst og ødelegge bakterier og andre mikroorganismer. (5) Likevel er det mange antibiotikum som ikke kommer fra mikroorganismer, men er kjemisk syntetiserte (5). Eller de kan være semisyntetiske som vil si at de er naturlige antibiotika som er kunstig modifisert for å få bedre effekt. (6 s.798) Det første antibiotikum Salvarsan var et syntetisk fremstilt antibakterielt middel, som først ble initiert av den tyske forskeren Paul Ehrlich tidlig på 1900-tallet. (5, 6 s.795) Senere i 1930 åra oppdaget Gerhard Domagk sulfonamidene, som blokkerer folsyresyntesen i bakterier (6 s.797). Disse midlene er bare bakteriostatiske. Virkningen deres ble derfor overgått av penicillin som ble isolert fra *Penicillium chrysogenum* av mikrobiologen Alexander Fleming i 1929 (5, 6 s.799, 7 s.353) I løpet av de neste 30 årene ble de fleste av dagens antibiotika oppdaget, bare et fåtall er kommet på markedet i ettertid (5, 8) De ulike antibiotika kan deles inn i grupper etter hvilke målmolekyl de har (5, 6 s.796). Disse er:

- Inhibering av cellevegg syntesen f.eks. β -laktam .
- Inhibering av protein syntese f.eks. tetrasykliner.
- Inhibering DNA og RNA syntese f.eks. quinoloner og rifamycin .
- Inhibering av Folsyresyntesen f. eks. trimetoprim.
- Påvirkning av celleveggenes permeabilitet f.eks. polypeptider.

(5, 6 s. 796-802)



Figur 1 Enkel oversikt over de ulike virkningsmekanismene hos antibiotika. (5)

2.2 De testede antibiotika

2.2.1 Ciprofloksacin

Ciprofloksacin er et fluorokinolon. Fluorokinolonene er bactericide ved å blokkere bakterienes DNA-gyrase. Dette hemmer igjen DNA-syntesen (9 :Fluorokinoloner). Ciprofloksacin utskilles hovedsakelig via nyrene og 30-60% er da aktivt. Halveringstiden er 4-6 timer (9 :Ciprofloksacin).

Kinoloner adsorberes sterkt til avløpsslam (10).

Antibakterielt-spektrum: Ciprofloksacin er et bredspekret antibiotikum som omfatter de fleste stammer av *Haemophilus influenzae*, *Legionella* og *Enterobakterier*. Ciprofloksacin har også effekt mot *Pseudomonas aeruginosa*, *Stafylokokker* og atypiske luftveisagens som *Mycoplasma pneumoniae* og *Chlamydophilia pneumoniae* (9 :Fluorokinoloner).

Resistens og resistensutvikling: Ciprofloksacin har liten effekt på *Pneumokokker*, *streptokokker* og anaerobe mikrober da disse er lite følsomme for antibiotikumet. Meticillinresistente gule og hvite *stafylokokker* er også ofte resistente mot fluorokinoloner.

I løpet av de senere årene har forekomsten av resistens mot fluorkinoloner økt betydelig hos *E. coli* og *Klebsiella spp.* både i Norge og internasjonalt (9 :Fluorkinoloner).

Miljøpåvirkning: Fluorkinolonene er de antimikrobielle midlene som har størst økoskygge av alle antimikrobielle midler (9 :Fluorkinoloner).

2.2.2 Doksisyklin

Doksisyklin er et tetrasyklin, og har bakteriostatisk virkning gjennom å binde seg til bakterieribosomene og slik hemme proteinsyntesen (9 :Tetrasykliner og glycylysykliner). Halveringstiden er 12-24 timer men kan nedsettes ved alkalisk urin (9 :Doksisyklin). Tetrasykliner kan påvirke mikrobenes økologiske balanse i naturen da de er kjemisk svært stabile. De senere årene har den kliniske nytten av tetrasykliner blitt betydelig redusert på grunn av utbredt resistensutvikling (9 :Tetrasykliner og glycylysykliner).

Antibakterielt-spektrum: Tetrasykliner kan være virksomme mot både gram-positive og -negative bakterier. De er aktive mot *Klamydia*, *Mykoplasma* og mange anaerobe bakterier samt *malariaplasmoider* (9 :Tetrasykliner og glycylysykliner).

Resistens og resistensutvikling: Resistens er ofte overførbart via plasmider eller andre mobile genetiske elementer (9 :Tetrasykliner og glycylysykliner).

2.2.3 Trimetoprim/Sulfametoksazol

Denne kombinasjonen blokkerer 2 ulike enzymatiske trinn i bakteriens tetrahydrofolsyresyntese (9 :Trimetoprim-sulfametoksazol). Trimetoprim blokkerer bakterienes dihydrofolatreduktase (9 :Trimetoprim) mens Sulfametoksazol virker som kompetitiv inhibitor for dihydropteroat syntetase (DHPS) (9 :Vanlige sulfonamider). Hver for seg er disse to midlene bakteriostatisk, men i kombinasjon gir de baktericid effekt (9 :Trimetoprim-sulfametoksazol). I kroppen metaboliseres både Trimetoprim og

Sulfametoksazol til delvis aktive metabolitter. Midlene utskilles hovedsakelig via nyrene og ca. 50% av Trimetoprim og 25% av Sulfametoksazol er da i aktiv form. For begge er halveringstiden ca. 11 timer (9 :Trimetoprim-sulfametoksazol). Sulfametoksazol er hydrofob men konverteres til vannløselige metabolitter i kroppen (11).

Antibakterielt-spektrum: Er aktive mot de vanligste gram-negative stavbakterier og gram-positive kokker (9 :Trimetoprim-sulfametoksazol).

Resistens og resistensutvikling: *Pseudomonas auroginosa* er naturlig resistent mot begge midlene (9 :Trimetoprim-sulfametoksazol) mens *Enterokokker* er resistente mot Sulfametoksazol (9 :Vanlige sulfonamider), anaerobe bakterier og gonokokker mot Trimetoprim (9 :Trimetoprim).

2.2.4 Penicillin G (Benzylpenicillin)

Alle Penicillinene inneholder en betalaktamring og hører til under betalaktamene (9 :Betalaktamasefølsomme penicilliner). Ca. 30% av antibiotikumet metaboliseres i leveren, legemiddelet utskilles så via nyrene. Halveringstiden er 30-60 min (9 :Benzylpenicillin). Penicillinene hemmer bakterienes celleveggsyntese og virker slik baktericide mot mange ulike bakterier. For Penicilliner er tid med legemiddelkonsentrasjon over MIC avgjørende for god effekt da midlene utviser tidsavhengig bakteriedrap (9 :Betalaktamasefølsomme penicilliner). Penicillin G er vannløselig (11) og ustabil i miljøet p.g.a. hydrolyse og fotolyse (12).

Antibakterielt-spektrum: Penicillin G påvirker villtypen av mange gram-negative kokker (meningokokker, gonokokker) og gram-positive kokker, stafylokokker, *Streptokokker* og *Pneumokokker*. Samt gram-negative stavbakterier som difteribakterier og *Listeria*, i tillegg til spiroketer (*Treporema Pallidum* og *Borellia*). *Peptostreptokokker*, *Peptokokker* og *Clostridier* er som oftest følsomme (9 :Betalaktamasefølsomme penicilliner).

Resistens og resistensutvikling: *Pseudomonas aeruginosa* og *Enterobacteriaceae* er naturlig resistente. Gram-negative anaerobe bakterier (Bacteroides) er vanligvis resistente,

mens gram-positive anaerobe bakterier vanligvis er følsomme (*Peptokokker*, *Peptostreptokokker* og clostridier) (9 :Betalaktamasefølsomme penicilliner).

Miljøpåvirkning: Gir liten økoskygge (9 :Betalaktamasefølsomme penicilliner).

2.2.5 Cefalotin

Cefalotin er et første generasjons cefalosporin. Cefalosporinene hører til under betalaktamene (9:Cefalosporiner). 20-30% av Cefalotin metaboliseres i kroppen. Halveringstiden er 30-60 min (9 :Cefalotin). Cefalotin virker baktericid ved å hemme celleveggsyntesen (9 :Cefalosporiner). Cefalotin er hydrofob men konverteres til vannløselige metabolitter i kroppen (11).

Antibakterielt-spektrum: Har hovedsakelig effekt mot gram-positive bakterier (9 :Cefalosporiner), men har også virkning mot flere gram - negative aerobe stavbakterier særlig mange enterobakterier (kan være sårbart for disse betalaktamaser). Viridansstreptokokker og betahemolytiske *Streptokokker* er som oftest følsomme. Cefalotin er aktivt mot *Stafylokokker* og betalaktamaseproduserende *Stafylokokker* (ikke meticillinresistente stammer) (9 :Cefaleksin).

Resistens og resistensutvikling: *Enterokokker* og *Pseudomonas aeruginosa* er naturlig resistente (9 :Cefaleksin).

Miljøpåvirkning: Cefalosporiner er sterkt resistendrivende og har stor økoskygge (stor påvirkning av miljø og normalflora), og skal derfor ikke benyttes dersom et mer smalspektret middel kan gjøre jobben (9 :Cefalosporiner).

2.3 Avløpsrensing

Norge er et land med lav befolkningstetthet, mye vann og lang kystlinje. Potensielle forurensningsproblemer som følge av kommunale utslipp ble derfor lenge løst ved

fortynning (utslipp i vassdrag og hav/fjorder). Først etter 1970 kom utbyggingen av renseanlegg ordentlig i gang som en følge av forurensning og algeoppblomstring forårsaket av fosfor i utslipp (13 s.411).

En så derfor behovet for rensing og det ble derfor i stor grad satset på kjemiske eller biologisk/kjemiske renseanlegg, som er spesielt rettet mot fjerning av fosfor. Samtidig med kjemisk fjerning av fosfor fjernes også mer enn 85% av suspendert stoff og mer enn 70% organisk stoff. Ved revisjon av forurensningsforskriften i 2006 ble EUs avløpsdirektiv implementert i Norge. Da måtte en møte kravet om sekundærrensing (dvs. god fjerning av organisk stoff) ved utslipp til ferskvann. Dette førte til etablering av biologisk rensing i tillegg til kjemisk (13 s.411).

Renseanleggene i Norge benytter seg per dags dato av mekanisk, kjemisk og biologisk rensing, eller en kombinasjon av disse, avhengig av om utslippet er til ferskvann/sjøvann eller et område som er definert som følsomt/mindre følsomt (13 s. 411-412).

Primærrensing, sekundærrensing og tertiærrensing er begreper som er knyttet til gitte krav til utslipp. Primærrensing er det samme som mekaniskrensing mens sekundærrensing kan oppnås ved både kjemisk og biologisk rensing. Tertiærrensing går ut på at en i tillegg til å fjerne slampartikler og organisk materiale også fjerner næringsstoffer som fosfor og nitrogen. Dette kan gjøres både med kjemiske og biologiske metoder, men i Norge er kjemisk felling av fosfor og biologisk fjerning av nitrogen mest benyttet (13 s.413).

Ulike renseprinsipper som benyttes til rensing er mekaniskrensing, kjemiskrensing og biologiskrensing (13 s.413).

Mekaniskrensing går ut på å separere slampartikler fra avløpsvannet ned til en partikkelstørrelse på 0,1 mm (partikler som er så store at de lar seg bunnfelle innen rimelig tid). For å få til dette benyttes sedimentering eller filtrering gjennom fine siler (13 s.413).

Kjemisk rensing består av 3 steg: utfelling, flokkulering og flokkseparasjon. Ulike kjemikalier tilsettes for å oppnå utfelling av oppløst og finpartikulært stoff. De små partiklene som da dannes bygges så opp til større partikler ved flokkulering, slik at de kan separeres fra vannet ved eks. bunnfelling (13 s.413).

Ved biologisk rensing omdanner mikroorganismer partikulære og løste stoffer i vannet til enkle forbindelser som CO₂ og cellemasse. Til dette kan det benyttes både aktivslamreaktorer der mikroorganismen oppholder seg fritt i vannet, eller biofilmreaktorer

der mikroorganismene vokser i biofilm på faste flater i reaktoren. Mikroorganismene separeres så fra vannet som biologisk slam (13 s.413).

2.3.1 Åse renseanlegg

Avløpsvann og kloakk fra Ålesund sykehus er koblet på kommunal ledning som går til Åse renseanlegg sammen med avløpsvann fra områdene Nørvasund, Hatlane, Åse, Spjelkavik og Fremmerholen (Joar Strand, Driftsleder ved Åse avløpsrenseanlegg). Åse renseanlegg ble bygget i 1992 og er et mekanisk/kjemisk renseanlegg. Til mekanisk rensing benyttes det et salanes filter som siler ut fast stoff i avløpsvannet. Det benyttes så kalk og flokkulering til å felle ut løst stoff og små partikler. Det dannes da partikler som er store nok til at de felles til bunnen. Ved sentrifugering fjernes mest mulig av de dannede partiklene og en får ca. 25% tørrstoff. Vannet går så gjennom prosessen en gang til. Tørrstoffet fra rensingen blir så kompostert, mens vannet slippes ut i Borgundfjorden ved renseanlegget.

Ved tilsetning av kalk øker pH på avløpsvannet, noe som tar livet av de fleste bakteriene i avløpsvannet (Joar Strand). Selv om bakteriene er døde, kan de fortsette å spre gener for antibiotika resistens ved at cellene lyserer og DNAet tas opp av andre bakterier i miljøet der avløpsvannet slippes ut (3).

2.3.2 Effekt av rensing

Hvor effektivt antibiotika fjernes gjennom denne renseprosessen avhenger av antibiotikumets fysiske og kjemiske egenskaper. I et renseanlegg kan antibiotikumet enten fjernes med tørrstoffet, slippes ut med avløpsvannet, mineraliseres eller brytes delvis ned til ulike nedbrytningsprodukter (14-17). Det eksisterer lite litteratur om hva som skjer med antibiotika i et renseanlegg med tanke på om det fjernes med tørrstoffet eller ikke. Men som Diaz-Cruz, Lopez og Barcelo skriver i sin artikkel "Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in solis, sediment and sludge" (14), er det sannsynlig at hydrofobe antibiotika (medikament) bindes til slammet og fjernes fra

avløpsvannet i større grad, mens vannløselige hovedsakelig forblir i avløpsvannet. Ciprofloksacin bindes til avløpsslam (10), og det er dermed sannsynlig at det bindes til flokkuleringspartikler og kan fjernes med tørrstoffet. Flere artikler tar for seg nedbrytning av ulike antibiotikum under rensing og i det naturlige akvatiske miljøet. De viser til at antibiotika kan mineraliseres eller brytes ned til ulike nedbrytningsprodukter ved nærmest alle mulige prosesser. Noen eksempler kan være fotodegradering (reaksjon p.g.a. UV lys) (14, 16) og nedbrytning av mikroorganismer (avhengig av forbindelsens biotilgjengelighet) (17).

Dagens kunnskap om hvilke nedbrytningsprodukter som dannes av de ulike antibiotika er fortsatt svært begrenset. En studie viser at fotodegradering av Ciprofloksacin til ulike nedbrytningsprodukter er vanlig og avhenger av pH i miljøet, men at disse produktene ikke er videre biologisk nedbrytbare (16).

2.4 Antibiotikaresistens

2.4.1 Hva er antibiotika resistens?

En av de viktigste drivkreftene til utviklingen av ny antibiotika de siste 50 årene har vært antibiotikaresistens. Antibiotikaresistens betyr at mikroorganismenes vekst ikke blir hemmet selv om det er cytotoksiske konsentrasjoner av antibiotika tilstede. Dette har vært et problem helt siden antibiotika ble introdusert. En økning i antall, mangfold og utvalg av organismene har også ført til store kliniske problemer. Antibiotikaresistens er et av de største utfordringene moderne medisin har akkurat nå (18).

Det finnes minst 2 klassifiseringer av antibiotikaresistente bakterier, eller såkalte “superbugs”.

Den første kategorien inneholder kjente patogene bakterier, hvorav mange er klassifisert i samme slekt og art som bakterier i menneskets normal flora. Disse kan ha gener for antibiotikaresistens og har ofte økt virulens. Meticillinresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), vancomycin-resistente enterokokker (VRE), og resistent *Escherichia coli* er under denne kategorien (18).

Den andre kategorien er opportunistiske patogener. Disse bakteriene gir som regel sykdom

bare for de som har et svakt immunsystem (feks. unge, eldre, gravide, kreftsyke), og gir ikke sykdom til friske individer. Disse organismene finnes i store antall i det naturlige miljøet (7 s.454), og kan ofte være resistente mot flere typer antibiotika (18).

Den viktigste opportunistiske patogene bakterien i slekten *Pseudomonas*, er *P. aeruginosa*, som er en vanlig sykehusbakterie (7 s.454).

2.4.2 Utvikling av antibiotika resistens

Det finnes ulike måter en bakterie kan utvikle antibiotikaresistens. Bakterier kan ha naturlig resistens. Dette betyr at resistensen ikke er påvirket av mennesker, men forårsaket naturlig. Denne egenskapen vil dermed gå i arv (vertikal overføring) (19). Bakterier kan få resistensgener fra andre bakterier, enten ved opptak av DNA (fra døde bakterier) som flyter fritt i miljøet (transformasjon) eller ved overføring av mobile genetiske elementer (plasmider), såkalt konjugasjon (20 s.106-109). Dette skjer lettest mellom nært beslektede bakterier, og betyr at resistente ikke-humanpatogene bakterier kan bidra til å skape resistens hos nært beslektede bakterier (3, 20 s.110).

En fjerde mulighet er transduksjon der en bakteriofag kan bidra med overføring av resistens gen (20 s.104-105). I nærvær av antibiotika vil bakterier uten resistens selekteres bort mens bakterier med resistens vil dermed ha økt overlevelsessjansje. Det blir dermed en naturlig seleksjon i miljøet. De bakteriene som overlever vil dermed overføre sitt genetisk materiale til den nye generasjonen (3). Bakterier deler seg veldig fort, og doblingstid kan være langt under en time. Sett i forhold til populasjonenes størrelse vil mutasjonsfrekvenser på $1/10^7$ til $1/10^{10}$ føre til at det ofte vil være bakterier som blir antibiotikaresistente (3). Mutasjonsfrekvens betyr antall organismer med mutasjon som kan måles i en gitt populasjon. Dette viser ikke når organismen har utviklet mutasjonen. Mutasjonsfrekvensen angående antibiotika vil dermed vise frekvensen av antibiotika resistens ved en gitt antibiotika konsentrasjon (21). De resistente bakteriene kan dermed overføre resistensgenet til andre bakterier. Det har tidligere vist seg at hyppigheten av antibiotikaresistens er proporsjonal med bruken av antibiotika (22).

Tabell 2 Hovedmekanismer for bakteriers resistensutvikling mot antimikrobielle midler (3).

Hovedmekanismer for resistensutvikling mot antimikrobielle midler.	
Antibiotika som mekanismen rammer	Resistensmekanisme
	1. Endret målmolekyl (gir nedsatt bindingsaffinitet)
Betalaktamantibiotika Eks: Penicillin G	Endrede penicillinbindende proteiner (PBPer): - Nytt PBP hos MRSA - Endrede PBPer ved transformasjon (f.eks pneumokokker). - Endrede PBPer ved mutasjon (f.eks akapsulære Haemophilus influenzae).
Kinoloner Eks: Ciprofloksacin	Mutasjoner hos DNA-gyrase og topoisomerase IV som gir lavere affinitet.
Sulfanomider Eks: Sulfametoksazol	Ny. Insensitiv dihydropteroat syntase. Økt mengde enzym.
Trimetoprim	Ny. Insensitiv dihydrofolatreduktase. Økt produksjon av målmolekyl.
Tetrasykliner Eks: Doksisyklin	Ribosomal skjerming.
	2. Antibiotika inn aktiviserende enzymer (svækker eller opphever antibiotikavirkningen).
	a. Nedsatt permeabilitet.
Betalaktamantibiotika Eks: Penicillin G	Betalaktamaser
Betalaktamantibiotika inklusiv kinoloner, tetrasykliner og trimetoprim (Penicillin G, Ciprofloksacin og Doksisyklin).	Bortfall av yttermembranproteiner (poriner).

	b. Aktiv effluks
Terasyklin, og florokinoloner (Doksysyklin og Ciprofloksacin).	Nytt eller økt effekt av membrantransportsystem i bakteriemembranen.
Dersom kombinasjoner av flere mekanismer skjer samtidig kan de intensivere hverandres effekt.	

2.4.3 Spredning av resistens fra kloakk

Bakteriell resistens mot antibiotika har blitt funnet i akvatiske miljø, da spesielt områder som er kontaminert med utslipp fra sykehus. I en undersøkelse fra Østerrike ble det påvist resistens i 16 av de 24 testede antibiotikaene hos *E. coli*. Antibiotikaresistente stammer viser også økning når renseanlegget håndterer sykehusavfall (1 s.143).

Genoverføring mellom mikroorganismer forekommer både i naturlige miljø og i renseanlegg (1 s.144). Undersøkelser har blitt gjort for å demonstrere overføringen av R-plasmid hos bakterier i lokal kloakk. Den gjennomsnittlige overføringsfrekvensen (beregnet som antall resistente mottakere som oppstår per motstandsdyktig donor) varierer mellom 4.9×10^{-5} og 7.5×10^{-5} . Den høyeste overføringsfrekvensen (2.7×10^{-4}) var observert mellom *Salmonella enteritidis* og *E. coli*.

Store mengder avløpsvann kommer inn i det marine økosystemet og kan inneholde resistente bakterier (23). Regnvann og vannstrømninger vil også kunne dra med seg antibiotikaresistente bakterier fra jord til sjø. Hva som skjer med disse bakteriene er fremdeles usikkert, men bakteriene vil bli stresset av den høye saliniteten de møter i det nye miljøet og av lite næring. Dette kan gjøre at de kommer inn i en tilstand hvor de er levedyktige, men kan ikke kultiveres (VNC - viable but nonculturable). Bakteriene mister dermed evnen til å lage kolonier på medie, men er fortsatt levedyktige siden deres biologiske funksjoner ikke er skrudd av (23).

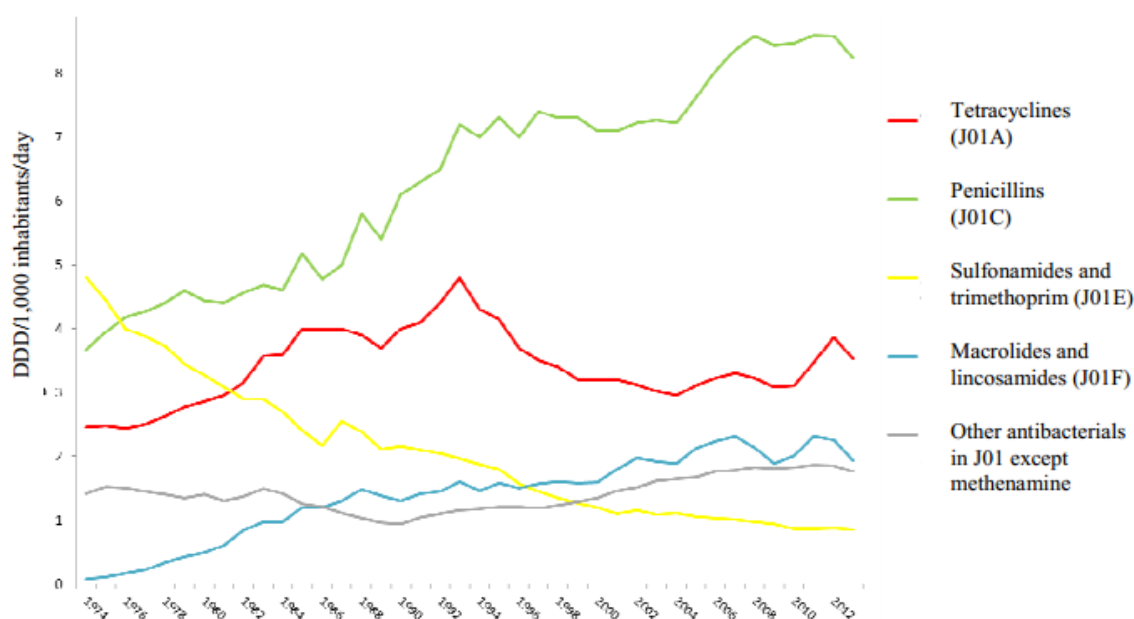
2.4.4 Resistensforhold i Norge

Fra år 2000 er resistensforholdene i Norge overvåket gjennom Norsk overvåkningssystem for antibiotikaresistens i mikrober (NORM). European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) gir sammenliknende europeiske data (3). Det finnes få studier gjort i Norge angående antibiotikaresistens. Det finnes en del studier fra utlandet, men man kan ikke uten videre bruke resultatene som fakta for Norge, ettersom holdningene til bruk av antibiotika kan være veldig annerledes (feks. at noen land har antibiotika uten resept). Overvåkingen av antibiotikaresistens vil gi bedre informasjon om hvordan problemet utvikler seg (4).

Tabell 2 Menneskelig bruk av antimikrobielle midler i Norge fra 2006-2012 fra ATC grupper. Bruken er vist ut fra DDD (Defined Daily Doses)/1.000 innbyggere/dag og i % forandring fra 2012-2013. Bildet under viser salg av antimikrobielle i Norge fra 1974-2013 (24).

ATC	Groups of substances	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	Change (%) 2012-2013
J01A	Tetracyclines	3.24	3.32	3.22	3.09	3.12	3.47	3.87	3.53	- 8
J01B	Amphenicols	0.002	0.001	0.001	0.002	0.001	0.0005	0.0002	0.0002	-
J01CA	Penicillins with extended spectrum	2.74	2.93	3.09	3.15	3.19	3.21	3.34	3.33	-
J01CE	Beta-lactamase sensitive penicillins	4.63	4.70	4.71	4.47	4.44	4.47	4.3	4.1	- 5
J01CF	Beta-lactamase resistant penicillins	0.66	0.72	0.77	0.80	0.82	0.88	0.90	0.78	- 13
J01CR	Combination of penicillins	0.01	0.02	0.02	0.02	0.03	0.03	0.04	0.05	+ 35
J01D	Cephalosporins, monobactams, carbapenems	0.60	0.60	0.60	0.58	0.55	0.56	0.55	0.52	- 5
J01E	Sulfonamides and trimethoprim	1.04	1.02	0.98	0.94	0.87	0.87	0.87	0.85	- 2
J01F	Macrolides, lincosamides and streptogramins	2.24	2.30	2.13	1.89	2.01	2.31	2.26	1.93	- 14
J01G	Aminoglycosides	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0.08	0.07	-
J01M	Quinolones	0.62	0.67	0.70	0.71	0.73	0.75	0.75	0.71	- 5
J01X*	Other antibacterials	3.18	3.30	3.48	3.65	3.84	3.93	4.04	4.12	+ 2
Total exclusive of methenamine		16.3	16.9	16.8	16.2	16.3	17.2	17.4	16.3	- 6
Total all antimicrobial agents		19.0	19.7	19.8	19.4	19.7	20.6	21.0	20.0	- 5

*J01X includes glycopeptides, colistin, fusidic acid, metronidazol (i.v.), nitrofurantoin, linezolid and methenamine. Of total J01X, methenamine constitutes 3.7 DDD/1,000 inhabitants/day in 2013.



2.4.5 Konsekvenser av antibiotikaresistens

Den største konsekvensen som kommer av vårt store forbruk av antibiotika, er at man kan ende opp uten mulighet til å helbrede sykdommer forårsaket av mikroorganismer. Det kan bli som tiden før antibiotika, hvor en vanlig infeksjon kan ta liv. Antibiotikaresistens vil

også ha konsekvenser for moderne medisinske behandlingsmåter p.g.a. infeksjonskomplikasjoner. Dette gjelder spesielt antibiotika profylakse (bruk av antibiotika for å forebygge infeksjonskomplikasjoner etter kirurgi) ved kirurgi (3). Med verden så åpen som den er nå (internasjonal handel og transport), kan disse resistente organismene spres lett, slik at dette blir et verdensomfattende problem. Ved seleksjon av resistente organismer ved antibiotika forbruk er det umulig å stoppe resistensutvikling, men det finnes måter man kan gjøre resistensutviklingen så liten som mulig (25). Dette kan gjøres ved å f.eks. la være å bruke bredspektrede antibiotika når det er mulig, og i stedet bruke smalspektrede antibiotika når man vet hvilken bakterie som forårsaker infeksjonen. Det har også vist seg at antibiotika virker like godt i mindre doser enn det som blir gitt. En kortere behandlingsperiode kan hjelpe mot å skape resistente organismer, da de blir utsatt for antibiotika i en kortere tid og mindre mengde (4). Med tanke på at utviklingen av nye antibiotika har stagnert (4), er det desto viktigere å ta vare på de antibakterielle midlene vi har. Disse er verdifulle legemiddel som bør benyttes på en slik måte at det utvikles minst mulig resistens (4).

2.5 Miljø

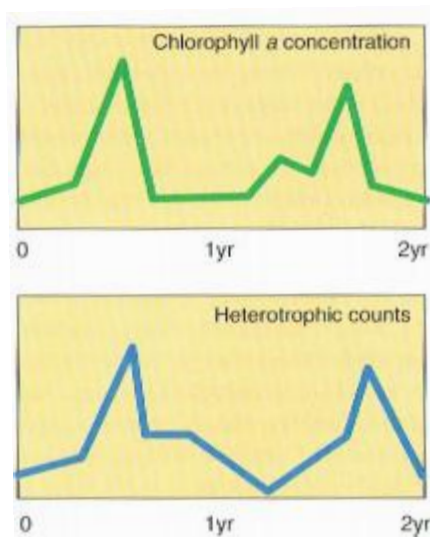
2.5.1 Habitat

Sjøvann er karakterisert ved en salinitet på mellom 33 og 37‰ (7 s.115). Havet er hele tiden i bevegelse på grunn av vær, tidevann og havstrømmer. Havet er delt inn i to soner; den eufotiske sonen (hvor lys trenger gjennom), og den afotiske sonen (hvor lys ikke trenger gjennom). Ved overflaten (luft-vann fase) blir habitatet kalt neuston. Den pelagiske sonen er ett vidt uttrykk brukt til å beskrive planktonisk habitat. En stor del av organismene som befinner seg i den eufotiske sonen er fotosyntetiske (7 s.116).

2.5.2 Marine bakterier

Miljøområdet har veldig mye å si for de ulike typer mikroorganismer. Populasjonene vil trives og dominere etter hvordan miljøet er. I dype vann vil den mikrobielle konsentrasjonen være høyest i neuston sonen og vil gå ned betraktelig under denne sonen. Rett under neustons vil tallene være på gjennomsnittlig 10^7 organismer/ml og blir redusert med mer enn 1 log på en dybde av 100m. Dermed er det et mye større antall bakterier rundt kysten enn det er i åpent hav (7 s.116).

To ganger i året vil det være en økning i bakteriepopulasjonene langs kysten; sent vår/tidlig sommer, og sent sommer/tidlig høst. Dette er periodene når fytoplanktonet er mest aktivt. Primærproduksjonen henger tett sammen med den generelle produktiviteten i havet (7 s.116).



Figur 2 Sammenhengen mellom klorofyll a konsentrasjon og mengden heterotrofe organismer.

Figur 2 viser at man får en økning i heterotrofe organismer rett etter en økning av klorofyll. Det betyr at autotrofe organismer vil gi en vekst til heterotrofe organismer (7 s.116).

Noen av slektene innen γ -subklassen av *Protobacteria* er essensielle komponenter i det marine habitatet. Slektene *Alteromonas*, *Pseudoalteromonas*, *Glaciecola*, *Idiomarina* og *Colwellia* har fenotypiske, genotypiske og fylogenetiske likheter. Disse lever i ulike habitat både langs kysten og åpen sjø (26). γ -Proteobacteria er de mest vanlige kultiverte bakteriene. α -Proteobacteria er den mest dominante typen funnet i marine habitat, ved bruk

av 16S rRNA teknikk, da disse ikke kan kultiveres i laboratoriet. Rundt 99.9% av bakteriene som lever naturlig i havet kan ikke kultiveres (27 s.4).

I det marine sedimentet vil vannmetning hindre at oksygen når ned i sedimentet, og den mikrobielle aktiviteten under de øverste centimeterne vil være anaerob. Høye næringsnivå i noen områder kan føre til så store oksygen krav fra mikrobene at vannområdet over sedimentet kan bli anoksisk (27 s.7).

2.4.4 Tarmbakterier og andre vanlige patogene bakterier i utslipp

De fleste patogene bakterier i husholdningsutslipp er tarmbakterier eller akvatiske bakterier (wastewater s. 130). Tarmbakteriene kan være av typene *Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* og *Campylobacter*. Bakterier av typene *Legionella*, *Mycobacterium*, *Aeromonas* og andre opportunistiske bakterier er noen eksempler innenfor de akvatiske bakteriene som finnes i utslipp (1 s.130-131). Bakteriene ved utslipp kan kategoriseres i 4 forskjellige grupper (1 s.131):

- Gram-negative fakultativt anaerobe bakterier (feks. *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* og *Shigella*.)
- Gram-negative aerobe bakterier (feks. *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*)
- Gram-positive sporedannende bakterier (feks. *Bacillus*)
- Gram-positive ikke-sporedannende bakterier (feks. *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Rhodococcus*)

2.5.4 Overlevelse av avløpsbakterier i sjøvann

Abiotiske faktorer som bestemmer overlevelsen av tarmbakterier i det marine miljøet vil være lys, salinitet, pH, næring, temperatur, hydrostatisk trykk og sedimentering. Biotiske faktorer vil være konkurranse, bakteriofager, antibiotika og giftstoff (28). Tarmbakterier som har blitt sluppet ut i det marine miljøet vil mest sannsynlig være VNC (28). Dette kan

dermed føre til at sykehusbakterier vil overføre resistens gen til marine bakterier gjennom plasmid overføring. I ett forsøk viste det seg at *Pseudomonas fluorescens* kunne overføre plasmid selv om den var i en VNC tilstand etter å ha blitt inkubert i sjøvann (23). Plasmid overføringen skjedde på en frekvens på 10^{-7} , noe som kan tyde på at plasmid overføringer kan skje selv om bakterien er i en VNC tilstand, og at dette dermed kan være mulig for sykehusbakterier, selv om de ikke danner nye kolonier. Dette kan være med på å opprettholde antibiotikaresistens i et marine miljø.

2.6 Eksempler på noen bakterier

2.6.1 *Pseudoalteromonas* sp.

Pseudoalteromonas er en vanlig marin bakterie som er funnet både i sjøvann og på ulike overflater som steiner og marine alger (29). Alle bakterier innenfor genuset *Pseudoalteromonas* er gram-negative, kjemoheterotrofe, obligat aerobe og avhengig av Na^+ for å vokse (29). *Pseudoalteromonas* spiller en viktig rolle i marine miljøer da de er tallrike og har høy metabolsk aktivitet. Bakterier innenfor genuset produserer et vidt spekter av metabolitter (biologisk aktive forbindelser og enzymer), og har mulighet til å tilpasse sin biokjemiske næringsvei. De er derfor svært overlevelsesdyktige i næringsfattige marine miljø (29, 30). Noen *Pseudoalteromonas* arter er opportunistisk patogen for marine dyr, inkludert fisk og krepsdyr (29). Det er uavklart om bakterien er naturlig resistent mot naturlig antibiotika i sitt miljø (29). Ulike arter innen genuset viser forskjellig følsomhet mot ulike typer antibiotika.

2.6.1.1 Noen arter innenfor genuset *Pseudoalteromonas* og deres følsomhet mot antibiotika

Pseudoalteromonas agarivorans viser resistens mot linkomycin (15 mg), benzylpenicillin (10 U), oxacillin (20 mg), tetrasyklin (30 mg) og O / 129 (150 mg). Den

vokser ved 7-35°C, med optimal vekst ved 20-28°C; ingen vekst ved 4 eller 40°C (31).

Pseudoalteromonas mariniglutinosa viser følsomhet for streptomycin, polymyxin, gentamicin, kanamycin, carbenicillin og neomycin, men motstandsdyktig mot ampicillin, oleandomycin, linkomycin, benzylpenicillin, O / 129, oksacillin og tetrasyklin. Den vokser ved 5-37°C med optimal vekst ved 20-28°C; ingen vekst ved 4 eller 40°C (32).

Pseudoalteromonas sagamiensis viser følsomhet for fradiomycin, gentamicin, lividomycin, ribostamycin, streptomycin, erytromycin, oleandomycin, rifampicin, kloramfenikol og tetrasyklin. Resistent mot dibekacin, kanamycin, linkomycin, ampicillin, carbenicillin, oksacillin, penicillin G og vancomycin. Vokser godt ved 15 og 35°C, men ikke ved 10 eller 40°C; optimal vekst ved 27°C (33).

Pseudoalteromonas spongiae viser følsomhet for benzylpenicillin, kloramfenikol, ampicillin og tetrasyklin. Motstandsdyktig mot streptomycin og kanamycin. Vokser mellom 4 og 44°C, men ikke ved 4 eller 52°C (34).

Pseudoalteromonas tetraodonis viser følsomhet mot til benzylpenicillin, carbenicillin, vancomycin og tetrasyklin. Vokser mellom 4-35°C, med optimal vekst mellom 25 og 30°C. Ingen vekst ved 40°C (35).

Pseudoalteromonas tunicata er følsom mot erytromycin, rifampicin, gentamicin, tetrasyklin, ampicillin, neomycin, kanamycin og nalidiksinsyre. Den kan vokse ved 4°C, men ikke ved 37°C (36).

Pseudoalteromonas ulvae har langsom vekst forekommer ved 4°C, og ingen vekst er observert ved 35°C. Følsom mot tetrasyklin, ampicillin, kanamycin, streptomycin, karbenicillin, kloramfenikol og spectinomycin. Resistent mot penicillin G (37).

Pseudoalteromonas arctica er en psykrofil bakterie som vokser ved temperatur mellom 4-25°C med et optimum mellom 10-15°C. Den tåler pH mellom 6-8 med et optimum mellom 7-8 og 0-9% NaCl, optimum 2-3% (30). Da denne bakterien ble påvist for første gang,

viste den 99% likhet i gensekvens (16S rRNA) med mest like bakterie innenfor genuset. Likevel var det stor nok forskjell til at det denne ble karakterisert som en ny art (28).

Pseudoalteromonas prydzensis er psykrofil, vokser ved en temperatur mellom 0-30°C med et optimum mellom 22-25°C (29). Det er ingen informasjon om resistens.

2.6.2 *Pseudomonas fluorescens*

Bakterien vokser optimalt ved 25-30°C og pH 4-8, men i tilfeller der den har forårsaket sykdom hos mennesket har den vist at den kan tilpasse seg høyere vekst temperatur, opp til 37°C som hos mennesker. *P. fluorescens* er opportunistisk patogen, men langt mindre patogen enn *Pseudomonas aeruginosa* (38). *P. aeruginosa* er også naturlig resistent mot en rekke forskjellige antibiotika (39). *P. fluorescens* er en gram-negativ, aerob, stav formet bakterie. På grunn av sin ekstremt metabolske allsidighet kan den leve i mange ulike miljøer, som jord, overflater på planter og i vann (38, 40).

Resistens profil

Følsom for: Gentamicin, neomycin, tetrasyklin, polymyxin B og colistin.

Muligens følsom for: carbapenems og ceftazidime.

Resistent mot: cloramphenicol, ampicillin og smal spektrene cefalosporiner.

Muligens lite følsom mot: andre cefalosporiner inkludert cefuroxime, cefotaxime, cefmenoxime og cefsulodin (40).

2.6.3 *Psychromonas arctica*

Ingen informasjon funnet om den er antibiotikaresistent. Biofilm dannende bakterie, med ekstra kromosomale elementer. Det er ikke mye kjent informasjon om ekstra kromosomale elementer (plasmider) hos psykrofile bakterier. De fleste psykrofile bakteriene er gram-negative Proteobacteria (41).

2.6.4 *Colwellia aestuarii*

Tilhører familien Colwelliaceae som tilhører gamma proteobakterier (42). Gram-negativ bakterie som vokser ved en temperatur fra 4°C – 32°C, optimalt ved 25°C – 30°C. Optimal pH: 7-8. Følsom for carbenicillin, cefalotin, kloramfenikol, gentamicin, kanamycin, neomycin, novobiocin, oleandomycin, penicillin G, polymyxin B og streptomycin, men ikke mot ampicillin, linkomycin eller tetrasyklin (42).

2.6.5 *Flavobacterium frigidarium*

Gram-negativ ubevegelig bakterie (43). Viser resistens mot ampicillin, neomycin, kanamycin, gentamicin og streptomycin. Bakterien har følsomhet for erytromycin, kloramfenikol, tetrasyklin og rifampicin. Forsøk med filter-papir disker som inneholdt de følgende antibiotika viste inhiberingssoner større enn 8 mm: fusidinsyre, kloramfenikol, tetrasyklin, erytromycin og ampicillin. Novobiocin (5 µg), penicillin G (1U), meticillin (10µg) og streptomycin (10 µg) disker førte ikke til noen veksthemming (43).

3. Material og Metode

3.1 Valg av metoder

Valg av referanseområde: Referanseområdet i den tidligere oppgaven (Gangstøvika) viste seg å gi mye resistens, slik at det ikke kunne benyttes til sammenligning med resultatet. Gangstøvika har vært et tidligere avfallsdeponi, og det ble oppgitt at dette kan være årsaken til resistens. Det var dermed ikke mulig at referanseområdet kunne sammenlignes med prøveområdet på grunn av eventuell forurensing (vedlegg 1). I denne oppgaven ble det derfor valgt to andre referanseområder; Flø og Alnes som ligger åpent ut mot havet og har mer sirkulering.

Valg av prøvetype: Det viste seg fra den andre oppgaven at det ikke var forskjell fra prøvene tatt fra dypt vann ved utløpsrøret og fra strandsonen, når det kom til resistensnivå. Det ble dermed tatt prøver kun fra strandsonen i denne oppgaven (vedlegg 1).

Valg av medie og antibiotika: VNSS er et selektivt medie for marine bakterier. Mediet vil derfor kunne få frem de ønskede bakteriene (marine bakterier), samtidig som det vil gjøre det lite sannsynlig med uønsket vekst. Det viste seg i den tidligere bacheloroppgaven at VNSS hadde god vekst, og ved å bruke det samme som i den tidligere oppgaven kan resultatet sammenlignes bedre. Ved å bygge på den andre oppgaven kan vi spare oss for unødig arbeid og feil, ved å benytte det som har vist seg å fungere bra.

Disk diffusjonstest: Dette er en vanlig metode for å påvise eventuell resistens. Denne metoden ble også benyttet i den tidligere oppgaven. For å kunne sammenligne resultatene med tidligere oppgave ble den også benyttet i denne oppgaven.

Hvorfor identifisere bakterieart: Ved å identifisere bakterieartene vil man få påvist hvilken type bakterie dette er. Siden oppgaven vår går ut på påvise resistens hos marine bakterier og kartlegge disse, må det undersøkes om det er marine bakterier som har denne resistensen. Selv om mediet er selektivt for marine bakterier vil det fortsatt styrke resultatene ved at vi kan påstå dette med sikkerhet. Ved å påvise bakterieart er det mulighet for å finne ut om bakteriene er naturlig resistent eller påvirket. Det kan gjøres ved

å undersøke resistensprofil, om tilgjengelig, fra de påviste artene. Det er ikke mulig å få et svar på om resistens er naturlig eller påvirket dersom ikke bakteriearten er kjent. Prøvene måtte dermed sekvenseres for å påvise arten, slik at disse kunne sammenlignes mot tidligere forskning gjort angående artens resistens.

Isolering DNA: Det ble valgt Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit for isolering av bakterielt DNA, da denne var tilgjengelig ved Høgskolen i Ålesund.

16S rRNA amplifisering: Det ble benyttet 16S rRNA prosedyre for PCR amplifisering. Dette er en prosedyre som er vanlig ved identifisering av arter, da det er et gen som de fleste organismer har. Denne prosedyren ble også anbefalt av veiledere. Det ble benyttet blank Mastermix da prøvene skulle sekvenseres. Farget Mastermix kan forstyrre sekvenseringen.

Elektroforese: Gel elektroforese ble valgt for å sikre resultatene etter PCR amplifiseringen. Dette ble gjort for å kontrollere at vi hadde fått PCR produkt, og at lengden på disse så like ut. Vi trengte ikke å benytte ladder da det ikke er nødvendig å kjenne PCR produktets lengde. 16s rRNA genet er tilnærmet likt for alle organismer. Vi trenger derfor bare å se at produktet for prøvene er forholdsvis like i lengde.

Rensing av PCR produkt: For å få vellykket sekvensering er det viktig å rense DNAet slik at det ikke er frie nukleotider og enkelttrådet DNA i prøven som vil forstyrre sekvenseringen. For rensing av PCR produkt ble det brukt ExoSAP-it kit da denne fjerner frie nukleotider og enkelttrådet DNA, og var tilgjengelig på Høgskolen i Ålesund.

Sekvenseringsreaksjon: Ved sekvensering må DNAet i prøven som skal sekvenseres være enkelttrådet, ellers er det ikke mulig å sekvensere den. For å få til dette benyttes en sekvenseringsreaksjon der kun den ene DNA tråden blir amplifisert. Denne metoden ble også anbefalt av veileder. Det ble benyttet blank Mastermix da prøvene skulle sekvenseres. Farget Mastermix vil forstyrre sekvenseringen.

Sekvensering: Prøvene ble sendt til sekvenslaboratoriet ved Universitetet i Bergen for sekvensering, da vi ikke har tilgang til dette ved Høgskolen i Ålesund.

Genetisk analyse: Til genetisk analyse ble programmet MEGA 6 benyttet. Dette programmet gjør det mulig å se over sekvensfilene. Programmet gjør det også mulig å slette forstyrrelser i begynnelsen og slutten av sekvensen, da de 20 første og siste basene er unøyaktige. Dette fjerner ikke noe av målgenet, da dette er tatt høyde for ved å benytte primere som kopierer opp mer enn selve genet. Denne sekvensen blir så sammenlignet med sekvensene som ligger i NCBI (National Center for Biotechnology Information) sin database for å identifisere bakterie art.

3.2 Prøvetakning og dyrkning.

3.2.1 Forberedelser

Tillaging av VNSS agar-plater (vedlegg 2)

NSS: Kunstig Sjøvann, Nine saltsolution.

VNSS: NSS tilsatt næringsstoffer, dyrkningsmedie for marine bakterier.

Utstyr:

Sterile Petriskåler

Autoklaveflasker på 1 liter

Målekolber:

3 stk. på 500ml

2 stk. på 100ml

1 stk på 10ml

VNSS-agarmedie ble laget etter følgende oppskrift.

1. Stamløsninger ble laget først etter følgende tabell

Tabell 3 Stamløsninger.

Stoff	
NaHCO ₃ Natriumhydrogenkarbonat	0,4 g/500 ml
KBr Kaliumbromid	0,2 g/500 ml
SrCl ₂ x 6H ₂ O Strontiumklorid hexahydrat	0,4 g/500 ml
FeSO ₄ x 7H ₂ O Jernsulfat heptahydrat	0,1 g/10 ml (Ikke holdbar, måtte derfor lage ny hver gang).
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O Natriumsulfat di hydrat	1,0 g/100 ml
H ₃ BO ₃ Borsyre	1,0 g/100 ml

2. NSS ble så laget ved å tilsette stoffene i tabellen under til en målekolbe med 700ml (1L NSS) eller 300ml (500ml NSS) grad II destillert H₂O.

Tabell 4 NSS

Stoff	1000 ml	500 ml
NaHCO ₃ (stamløsning) Natriumhydrogenkarbonat	100 ml	50 ml
KBr (stamløsning) Kaliumbromid	100 ml	50 ml
SrCl ₂ x 6H ₂ O Strontiumklorid hexahydrat (stamløsning)	10 ml	5 ml
H ₃ BO ₃ Borsyre (stamløsning)	10 ml	5 ml
NaCl Natriumklorid	17,60 g	8,8 g
Na ₂ SO ₄ Natrium sulfat	1,47g	0,735 g

KCl Kalium klorid	0,25 g	0,125 g
MgCl ₂ x 6H ₂ O Magnesium klorid hexahydrat	1,87g	0,935 g
CaCl ₂ x 2H ₂ O Kaliumklorid di hydrat	0,41g	0,205 g

- Da alle kjemikaliene var løst ble pH justert til 7,0 med ca. 0,9 ml 0,1M HCl (dråpevis) per 1000ml. Ved hjelp av et pH-meter ble pH i løsningen kontrollert.
- Volumet ble så justert til 1000 ml / 500 ml ved hjelp av en målekolbe og blandet godt før den ble fordelt i 1000 ml autoklaveflasker, 500 ml i hver.
- Løsningen ble så autoklavert på vanlig måte, 121°C i 15 minutter.
- Etter autoklivering tilsattes følgende stoff til hver flaske, som så ble om rørt ved hjelp av en magnetrører.

Tabell 5 VNSS

Stoff	Mengde til 500 ml
NSS, pH 7,0	500 ml
Peptone	0,5 g
Gjærekstrakt	0,25 g
Glukose	0,4 g
FeSO ₄ x 7H ₂ O (stamløsning)	0,5 ml
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O (stamløsning) Di-Natrium hydrogenfosfat	0,5 ml
Agar	7,5 g

7. Mediet ble autoklavert i 121°C i 15 minutter.
8. Etter autoklaving fikk mediet kjøle seg ned til ca. 60°C før det ble fordelt i sterile petriskåler. Mediet ble oppbevart kjølig inntil bruk (max.1 uke da det ellers vil tørke ut).

3.2.2 Prøvetakning

Tirsdag 10.03

Utstyr og reagenser:

VNSS agarplater

Sterile prøverør

Sterile svaberpinner

Hansker

Prøver ble samlet inn fra prøveområdet Åse (Åsestranda) og referanseområdene Alnes (Sandvika) og Flø (Gåsneset) ved lavvann. Fra hvert område ble det tatt 3 sediment prøver fra ulike områder på strandsonen (øverst, midt og i vannkanten). Der det var mulig ble det tatt med både sand og sjøvann i prøven (fra sjøkanten og pytter på stranden dannet av lavvannet).

Det ble også tatt 3 svaber utstryk fra hvert område. Disse prøvene ble tatt fra de samme områdene på stranden som sediment prøvene. De 3 svaberutstrykene fikk derfor samme navn som sediment prøvene men med en S på slutten. Svaberpinnene ble strøket over steiner og tang og deretter strøket over agar-platene. Prøvene ble tatt fra de øverste centimeterne på sedimentet for å sikre flest mulig aerobe bakterier.



Figur 3 Prøve 1, 2 og 3 på Alnes. 1 fra øverst i stranden, 2 midt og prøve 3 fra sjø.



Figur 4 Kart over prøveområde på Alnes.



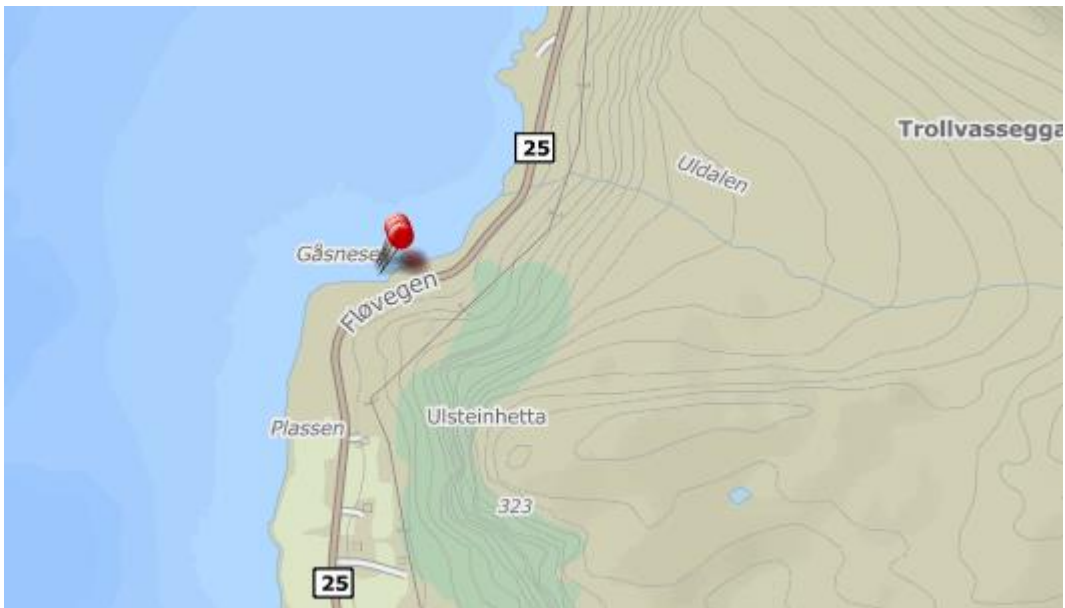
Figur 5 Prøve 1, 2 og 3 fra Åse. Prøve 1 øverst, prøve 2 midt og prøve 3 fra sjø.



Figur 6 Kart over prøveområde på Åse.



Figur 7 Prøve 1, 2 og 3 fra Flø. Prøve 1 øverst, 2 midten og prøve 3 fra sjø.



Figur 8 Kart over prøveområde på Flø.

3.2.3 Dyrkning på agar plater

Tirsdag 10.03

Utstyr og reagenser:

VNSS agarplater

Autoklavert sjøvann

Glass stav

Bunsenbrenner

96% etanol

Prøvene ble tatt med til laboratoriet samme dag som prøvetakning for utstrykning på agarplater. Her ble her benyttet VNSS agar da denne er selektivt for marine bakterier. (Vedlegg 2)

Noen av prøvene hadde veldig lite vann ettersom de var tatt lengre oppe på stranden. Disse ble tilsatt sterilt sjøvann og omrørt, slik at bakteriene som var bundet til sand partiklene fikk løsne og flyte fritt i vannet. Deretter kunne de såes over på agarplater. Dette gjelder prøve 1Å og 2Å fra Åse og prøve 1A fra Alnes. Det ble sådd ut to paralleller for hver sediment prøve.

1. Prøvene ble ristet forsiktig for å få mest mulig bakterier omrørt i vannet.
2. 0.1 ml vann fra prøvene ble pipettert ut over agarplatene.
3. Glass stav ble brukt til å spre prøven utover agaret.
4. Staven ble så lagt i etanol og brent av med bunsenbrenner før neste prøve.
5. Prøvene ble inkubert på 12.5° i 3 døgn.

3.2.4 Dyrkning av renkulturer

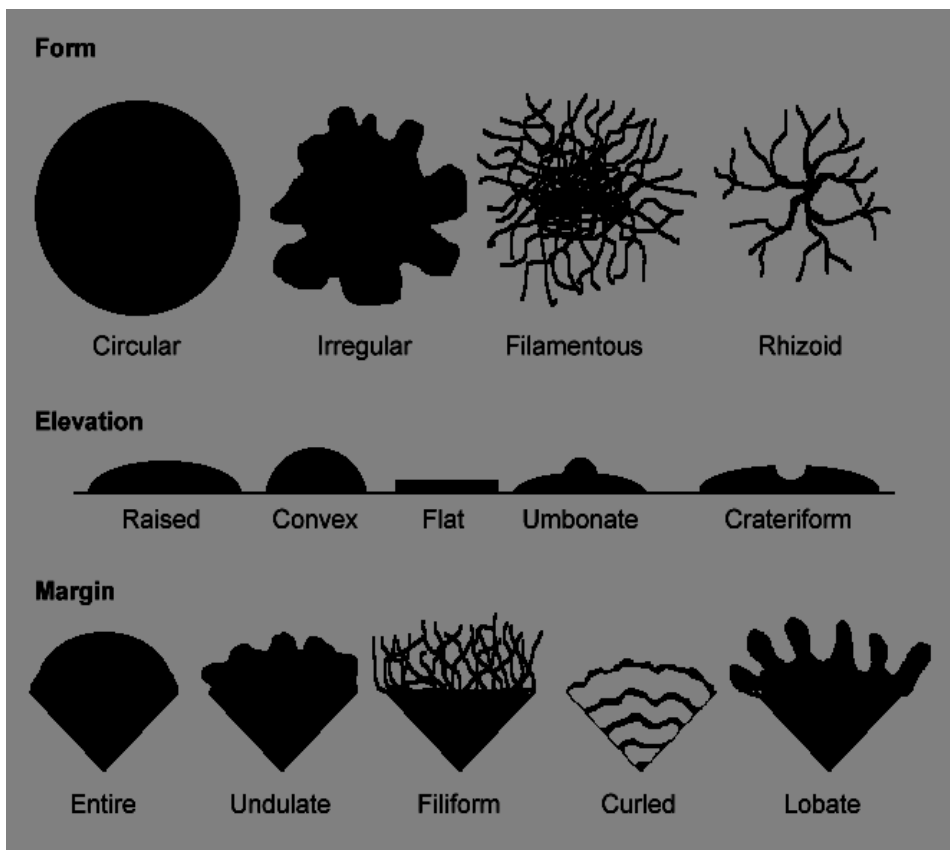
Utstyr og reagenser:

VNSS agarplater

Bunsenbrenner

Podeøser

Fra svaberutstrykene og det som var sådd ut fra sediment prøvene ble det valgt ut 15 kolonier fra hvert område. Koloniens utseende ble studert for å prøve å få frem størst mulig mangfold av bakterier. Bildet under ble brukt til å velge ut de ulike koloniene basert på form, høyde og margin.



Figur 9 Bilde brukt til bestemmelse av ulike kolonier (44).

Disse koloniene ble strøket ut på nye agarplater med fortynningsteknikk for å få renkulturer.

Det ble da 15 agarskåler fra hvert område, totalt 45 agarskåler.

3.3 Testing av antibiotikaresistens (agar diffusjonstest)

(Vedlegg 3)

Utstyr og reagenser:

Sterilt fysiologisk saltvann 0,9% NaCl.

Agarplater

Antibiotika tabletter (PENG1, CEP30, SxT25 og CIPR5)

100 rør med 5 ml saltvann ble tillaget etter oppskrift: 9 g NaCl per 1 L destillert vann, og autoklavert.

Utføring av resistensbestemmelse ved bruk av Flytmetode:

1. Slemmet opp 5-6 kolonier i 5 ml sterilt saltvann tilsvarende 0.5 Mc Farland med en pipette, og blandet godt.
2. Overførte så 1 dråpe av oppslemmingen til et nytt sterilt saltvannsglass, og blandet godt.
3. Pipetterte over resistensskål til hele agaren var dekket og sugde opp overskytende væske.
4. Lot så skålen tørke (10-15 minutt)
5. Tilsatte aktuelle antibiotika-tabletter ved hjelp av dispenser.
6. Lot skålen stå til pre-inkubering i 15 minutter.
7. Inkuberte skålen i 3 døgn ved 12.5°.

Det ble laget tre paralleller for hver renkultur.

3.4 DNA isolering

4 prøver fra Alnes, 5 fra Flø og 7 fra Åse ble tatt med videre, da disse viste liten eller ingen sensitivitet for et eller flere antibiotika.

Utstyr og reagenser:

Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit

Mikrosentrifugetuber på 2 ml. (eppendorf).

Benyttet Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (vedlegg 4) og følgende prosedyre:

1. Plukket ut kolonier direkte fra agarplatene (omtrent 20 kolonier), og løste de i 180 µl buffer AL. Blandet med vortex i 10 – 20 sekunder.
2. Inkuberte prøvene ved 37°C i 30 min.
3. Tilsatte 25 µl proteinase K til tuben, og 200 µl Buffer AL. Blandet kort med vortex.
4. Inkuberte prøvene ved 56°C i 30 min.
5. Tilsatte 200 µl 96% etanol til tuben, og blandet med vortex.
6. Pipetterte alt i tuben (ca. 600 µl) over til en spin kolonne og sentrifugerte på 6000 x g i 1 min.
7. Fjernet kolonnen fra oppsamlingsrøret og satte den i et nytt oppsamlingsrør. Tilsatte 500 µl Buffer AW1 til kolonnen og sentrifugerte på 6000 x g i 1 min.
8. Fjernet kolonnen fra oppsamlingsrøret og satte den i et nytt oppsamlingsrør. Tilsatte 500 µl Buffer AW2 til kolonnen og sentrifugerte på 20000 x g i 3 min.
9. Fjernet rørene forsiktig fra sentrifugen for at oppsamlingen ikke skal berøre kolonnen. Kolonnen ble overført til et 1.5 ml rør og tilsatt 100 µl Buffer AE. Lot røret stå i romtemperatur i 1 min før sentrifugering i 6000 x g i 1 min.

10. Gjentok steg 9 for mest mulig utbytte. Kastet kolonnen og frøs ned DNA på -20°C .

3.5 Amplifisering av mål gen (16S rRNA)

Utstyr og reagenser:

PCR maskin

Polymerase

Primere: 16S rRNA 341f og 907r.

ddH₂O

PCR ble benyttet til å oppkonsentrere 16s rDNA genet etter følgende prosedyre (vedlegg 5):

1. Laget mastermix til 20 prøver etter følgende tabell.

Tabell 6 Oppskrift på mastermix.

Komponent	Start konsentrasjon	Per reaksjon	Mastermix (for 20 prøver).	Konsentrasjon i løsning
Polymerase	2x	7,5 µl	150 µl	1x
Primer fwd (5')	10 µM	0,75 µl	15 µl	0,5 µM
Primer rwd (3')	10 µM	0,75 µl	15 µl	0,5 µM
ddH ₂ O	nukleasefritt	3 µl	60 µl	-

2. Fordelte 12 µl mastermix til hvert PCR-rør.
3. Tilsatte 3 µl templat (DNA) til hvert rør, ikke negativ kontroll.
4. Negativ kontroll inneholdt kun mastermix som en intern kontroll på at mastermixen

- ikke var forurenset med DNA.
5. Blandet lett med vortex og sant ned.
 6. PCR rørene ble satt i PCR maskina på følgende program:

Tabell 7 PCR program 16S rDNA.

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Innledende denaturering	95°C	10 min.	1
Denaturering	95°C	30 Sek.	35
Annealing	58°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	1 min.	
Elongation	72°C	10 min.	1

PCR produktet kontrollert ved elektroforese umiddelbart og så fryst ned til -20°C.

3.5.1 Elektroforese

Utstyr og reagenser:

Loading dye
 Agarose pulver
 1x TAE buffer
 GelRed TM

Utføring (vedlegg 6):

1. Veide opp 1.8g Agarose
2. Målte opp 80 mL 1x TAE buffer
3. Blandet i 500 mL erlendmeyerkolbe
4. Kokte blandingen ved full styrke i mikroovn i 2 min.

5. Tilsatte 1.0 µl GelRed og rørte om slik at fargestoffet fordelte seg i væsken.
Kjølte så ned til 65 °C.
6. Overførte agarosen til gelkar og satte i kammer.
7. Tilsatte 1 µl loading dye til prøverørene og tilsatte deretter 3 µl PCR produkt.
8. 3 µl av prøvene ble tilsatt i hver brønn, 16 prøver og 1 negativ kontroll.
9. Satte på spenning 100V og lot stå i 45 min.
10. Tok bilde av gelen i UV lys.

3.6 Rensing av PCR produkt

ExoSAP-IT ble benyttet til rensing med følgende prosedyre (vedlegg 7):

1. 3 µl PCR produkt og 1 µl ExoSAP-IT ble tilsatt nye PCR-rør.
2. Ble satt til inkubering ved 37°C i 15 min for å få optimale forhold for ExoSAP-IT (enzymene).
3. Ble så inkubert ved 80°C for å inaktivere ExoSAP-IT.

3.7 Sekvenseringsreaksjon

Utstyr og reagenser:

Primer 341f

Big Dye

Big Dye Buffer

ddH₂O

(vedlegg 8)

1. Laget til 15 prøver etter tabell 7.

Tabell 8 Oppskrift på mastermix til sekvenseringsreaksjon.

Primer 341f	4,8 µl
Big Dye	15 µl
Big Dye Buffer	15 µl
ddH ₂ O (nukleasefritt)	70,2 µl

2. Tilsatte 7 µl mastermix i 13 PCR-rør og tilsatte 3 µl rensset PCR produkt (templat) til hvert rør.
3. PCR rørene ble satt i PCR maskinen på følgende program.

Tabell 9 PCR program, sekvenseringsreaksjon.

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Denaturering	96°C	6 min.	1
Denaturering	96°C	10 Sek.	25 sykluser
Annealing	50°C	5 Sek.	
Elongation	60°C	4 min.	

Prøvene ble tilsatt 10 µl ddH₂O hver og lagret ved -20°C til neste dag. Da ble de sendt til Sekvenslaboratoriet ved Universitetet i Bergen for sekvensering.

3.8 Genetisk analyse

MEGA 6 ble benyttet til genetisk analyse. Følgende ble gjort for å sikre best mulige resultater.

1. Sekvensfilene ble åpnet og støy i begynnelsen og slutten av kromatogrammet ble tatt bort.
2. Filene ble lagt til Alignment Explorer.

3. BLAST søk på hver prøve med «Highly similar sequences (megablast)».
4. Prøvene blir så søkt opp i NCBI nukleotid databasen og derfra ble det valgt ut genuset/arten med høyest genetisk likhet.

4. Resultat

4.1 Resultat fra disk diffusjon test

Kun prøver med minimum 2 paralleller ble tatt med videre, da de med 1 ble regnet for å være for usikre (vedlegg 9). Prøvene som er merket i rød farge ble tatt med videre til sekvensering, da de er mindre følsomme enn de andre prøvene. Dette ble bestemt ved å regne ut gjennomsnittet for hver prøve (3 paralleller), og så sammenligne de ulike prøvene (se tabell 13, 14 og 15). Prøver med de minste sonene, ifølge gjennomsnittet, ble valgt ut til sekvensering. Bakteriene er ukjente og man kan dermed ikke følge en standard tabell for resistensbestemmelse.

Tabell 10 Soner for prøvene fra Flø.

Prøve	PENG1	CEP30	DOX30	SxT25	CIPR5
4F2	20,33	19	27	40,33	51
4F3	0	0	27,33	37,67	43,67
1F1S	31,67	34	39	31	34,5
1F2	13,33	5,33	43	47	64
3F2	7,33	17,67	28	42,5	56
1F3	0	0	26	34	38
1F1	14,67	21	48	41,33	67
2F3	59	50	54	65	64
3F3	0	25	28	0	32

Tabell 11 Soner for prøvene fra Alnes.

Prøve	PENG1	CEP30	DOX30	SxT25	CIPR5
1A3	32,67	40	50	56	60
3A3	0	13	30	34	44
2A3	0	6	40	31	50
1A1	37,5	45	46	44	67
A2S	27	53	49	58	65
3A1	0	3,33	26,33	35	48
2A1	0	28,5	26	34	48
A1S	45	49	42	57	68

Tabell 12 Soner for prøvene fra Åse.

Prøve	PENG1	CEP30	DOX30	SxT25	CIPR5
1Å1	0	0	20	31,3	46
2Å3	22,6	31	47	52	69
3Å1	0	0	19,3	29,3	36
2Å1	15	7	25	-	-
2Å2S	0	0	32	30	30,3
Å1S	0	0	25	28,3	47,3
2Å2	24,6	29	24	55	47
1Å3	0	0	30	26,5	46,5
1Å2S	0	14,3	31	39	54
1Å2	0	0	27,6	43	44,3

Prøver markert med rødt ble sendt til sekvensering. Prøver markert med gult ble ikke sendt inn da det ikke ble dannet noe PCR produkt. De blanke prøvene ble ikke tatt med videre siden sonene var store, og det ble konkludert med at de var sensitive mot de testede antibiotika typene.

Tabell 13 Gjennomsnittlig diameter i mm for Flø.

Gjennomsnitt i diameter (mm) for FLØ	
PENG1	16,25888889
CEP30	19,11111111
DOX30	35,59222222
SxT25	37,64777778
CIPR5	50,01888889

Tabell 14 Gjennomsnittlig diameter i mm for Alnes.

Gjennomsnitt i diameter (mm) for ALNES	
PENG1	17,77125
CEP30	29,72875
DOX30	38,66625
SxT25	43,625
CIPR5	56,25

Tabell 15 Gjennomsnittlig diameter i mm for Åse.

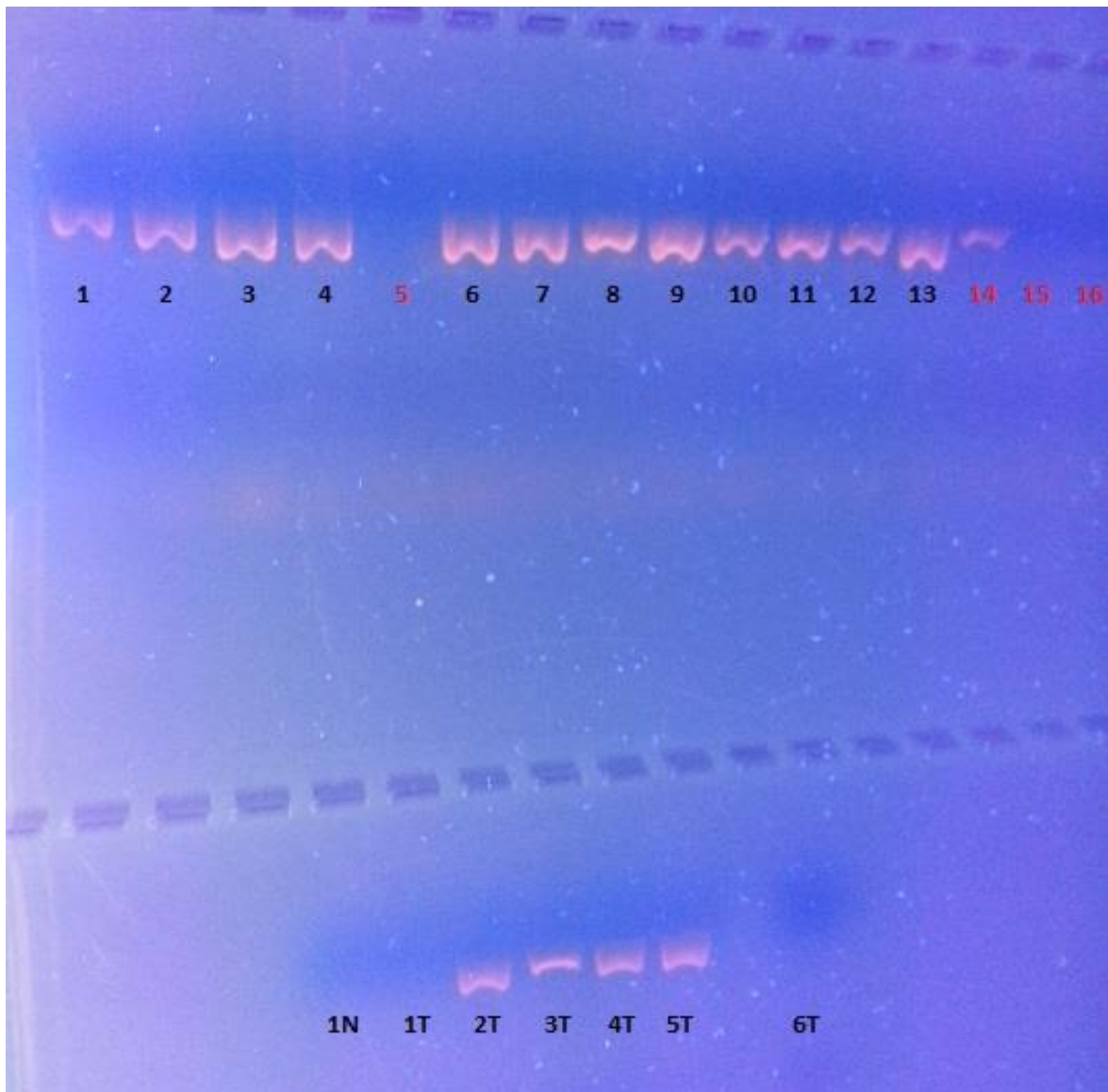
Gjennomsnitt i diameter (mm) for ÅSE	
PENG1	6,22
CEP30	8,13
DOX30	28,09
SxT25	37,15555556
CIPR5	46,71111111

Tabell 16 Gjennomsnittlig diameter i mm for alle områdene.

Gjennomsnitt i diameter (mm) for alle områdene	
PENG1	12,98888889
CEP30	18,19
DOX30	33,72444444
SxT25	39,31653846
CIPR5	50,79115385

4.2 Elektroforese

Gelen ga bånd med ganske like lengder. Prøve nr. 5, 14, 15 og 16 vistes som negativ. Negativ kontroll var negativ.



Figur 10 Øverst: Prøve 1-16. Nederst: 1N = Negativ kontroll. 1T-6T = Negativ kontroll tester

4.3 Genetisk analyse

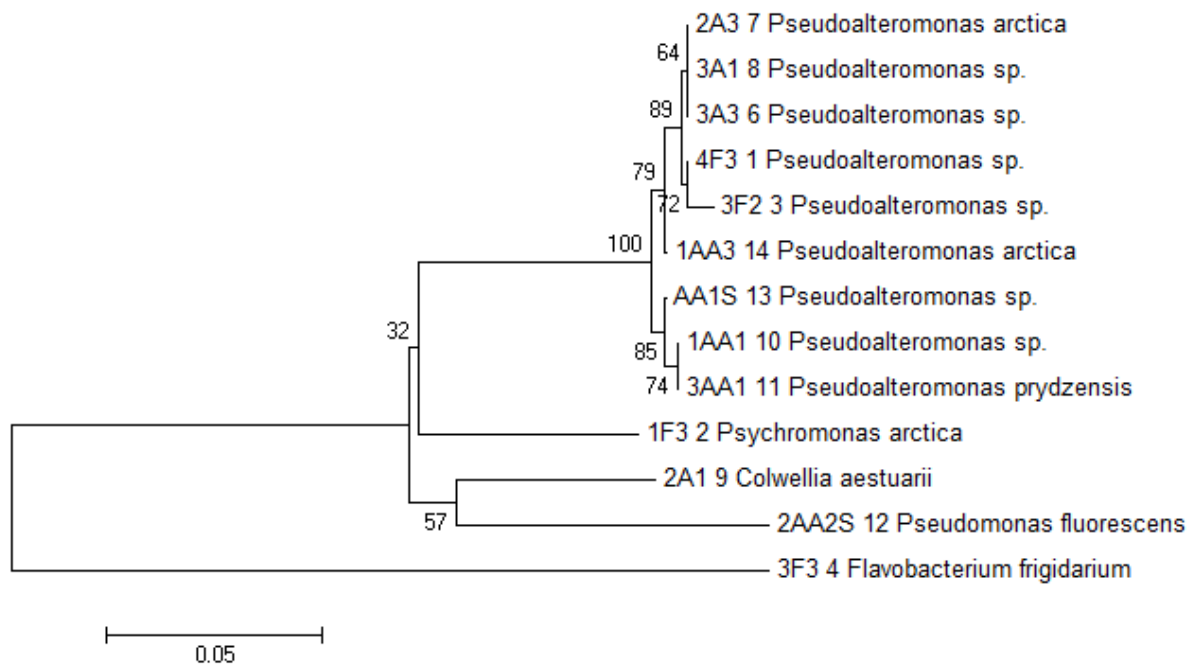
Fra søk i BLAST ble følgende bakterier funnet (se tabell 17). Tabellen viser også genetisk likhet mellom prøvene og det nærmeste resultatet fra BLAST.

Species/Abbrv	Group Name																																																		
1. 4F3 1	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>																																																		
2. 1F2 2	<i>Psychromonas arctica</i>																																																		
3. 3F2 3	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>																																																		
4. 3F3 4	<i>Flavobacterium frigidarium</i>																																																		
5. 3A3 6	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>																																																		
6. 2A3 7	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>																																																		
7. 3A1 8	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>																																																		
8. 2A1 9	<i>Colwellia aestuarii</i>																																																		
9. 1AA1 10	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>																																																		
10. 3AA1 11	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>																																																		
11. 2AA2S 12	<i>Pseudomonas fluorescens</i>																																																		
12. AA1S 13	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>																																																		
13. 1AA3 14	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>																																																		

Figur 11 Resultat fra BLAST søk i MEGA 6

Tabell 17 Påviste bakterier fra BLAST søk

Prøve nr.	Prøve navn	Påvist bakterie	Genetisk likhet (%)
1	4F3	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	99%
2	1F2	<i>Psychromonas arctica</i>	100%
3	3F2	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	99%
4	3F3	<i>Flavobacterium frigidarium</i>	100%
6	3A3	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	100%
7	2A3	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	99%
8	3A1	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	99%
9	2A1	<i>Colwellia aestuarii</i>	99%
10	1Å1	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	99%
11	3Å1	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i>	100%
12	2Å2S	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99%
13	Å1S	<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	100%
14	1Å3	<i>Pseudoalteromonas arctica</i>	99%



Figur 12 Neighbour-joining tree som viser slektskap mellom påviste bakterier (MEGA 6).

Tabell 18 Gjennomsnitt *Pseudoalteromonas sp.*

Gjennomsnitt i mm for <i>Pseudoalteromonas sp.</i>					
Område	PNG 1	CEP30	DOX 30	SxT25	CIPR5
Flø	3.66	8.835	27.66	40.085	49.835
Alnes	0	7.4433333	32.11	33.333333	47.333333
Åse	0	0	23.57	28.85	43.95

5. Diskusjon

5.1 Påviste bakterier

Det viser seg at de fleste bakteriene vi har påvist hører til γ -Proteobacteria og genuset *Pseudoalteromonas*, noe som stemmer med teorien da disse type bakterier er en av de dominerende i det marine miljøet. *Flavobacterium frigidarium* er den eneste bakterien som ikke kommer fra γ -Proteobacteria klassen.

Siden prøvene ble tatt tidlig i mars er klimaet ganske kaldt, og det er lite sollys. Dette kan ha en effekt over hvilke bakterier som har best vekstvilkår. Det vil være mindre tilgang til lys og dette betyr at antall fototrofe organismer vil minke. Dette vil også gi et lavt antall heterotrofe organismer som er avhengig av denne økningen i biomasse for å få hyppigere vekst. Hadde prøvene blitt tatt om sommeren kunne en fått en helt annen bakteriell komposisjon enn tidlig på våren. Dette vil variere etter årstid og selvsagt varierende omstendigheter som sollys. Om sommeren vil vannet også være varmere, noe som gjør at andre bakteriearter trives bedre. Siden mange av prøvene ga psykrofile bakterier tyder det på at disse bakteriene har en klar fordel i det kalde klimaet.

Innenfor genuset *Pseudoalteromonas* er det tidligere funnet ulike arter med opptil 99% likhet i gensekvens (16S rRNA). Dette ble omtalt i artikkelen «*Pseudoalteromonas arctica* sp. nov., an aerobic, psychrotolerant, marine bacterium isolated from Spitzbergen», hvor det forkommer et lignende resultat. Til tross for dette har de likevel blitt karakterisert som ulike arter. Siden enkelte av bakteriene vi påviste ga ett resultat på 99% kan, dette bety at det er en mulighet for at disse er forskjellige arter, og at BLAST søket derfor viser bakteriearten som er nærmest beslektet. Dette kan også skyldes avlesningsfeil ved sekvensfilen, da det var noen områder med støy på noen av filene. Mye støy på en del filer kan også ha ført til at det har blitt klippet bort mer enn det som er ønskelig. Dette kan føre til at resultatene blir mindre spesifikke.

Ifølge figur 12 viser prøve nr. 3A3, 3A1 og 2A3 stor genetisk likhet, da viser nært slektskap. 2A3 hadde en genetisk likhet på 99% (tabell 17) med *P. arctica*. Det er dermed en mulighet for at disse prøvene er samme art. Prøve 1Å3 deler også genetisk likhet med

P. arctica på 99%. De to *P. arctica* (2A3 og 1Å3) ligger derimot et stykke unna hverandre, og det er sannsynlig at den ene er ukorrekt.

5.1.2 Mangfold

Ut fra resultatet kan vi ikke konkludere med forskjell på bakteriemangfoldet i de ulike områdene. Det er for få prøver til å vise dette. Dersom flere prøver ble tatt, hadde det vært lettere å vise til eventuell forskjell.

5.2 Amplifiserings reaksjon

I noen av prøvene fikk vi manglende PCR produkt (nr. 5, 15 og 16). 16S rRNA prosedyren ble gjentatt 3 ganger. Disse prøvene ble alltid negativ, selv om det ble foretatt ny isolering av DNA. Det er lite sannsynlig at dette skyldes lavt DNA innhold, da vi benyttet flere kolonier på disse prøvene enn de andre (pga. negativt resultat første gang). Det er mulig at DNAet i disse prøvene er konstruert slik at primerene ikke kan festes, og gir dermed ikke noe resultat.

5.3 Resistensbestemmelse

Det finnes ingen fasitsvar på resistensbestemmelse av de marine bakteriene vi har funnet, da tabeller for resistens som regel tar for seg patogene bakterier. Noen av bakteriene vi påviste er også nye, eller har manglende informasjon angående resistens. Det ble dermed valgt å sammenligne sonene med gjennomsnittsonene for alle områdene (tabell 13, 14 og 15).

Når man sammenligner resultatene fra de ulike områdene etter testing på antibiotika, ser en at det er tydelig forskjell mellom Åse og de to referanse områdene. Gjennomsnittet for Åse tyder på at der i større grad er bakterier med mindre følsomhet, spesielt for antibiotika typene penicillin G, cefalotin og doksosyklin. Dette vises også når man sammenligner

gjennomsnittet for *Pseudoalteromonas* fra de ulike områdene. Fra tabellen ser man at gjennomsnittet er tydelig lavere for Åse enn de to referanse områdene, selv om disse bakteriene skal være under samme genus. Dette kan bety at utslipp av antibiotika fra renseanlegget påvirker bakteriene, og fører til et naturlig utvalg hvor de resistente bakteriene har bedre overlevelse enn de uten. Bakterier med denne fordel vil raskt kunne erstatte de som er følsom for antibiotika. Grunnen til dette er at de fleste bakterier har en rask doblingstid.

Resultatet viser også at det er mye resistens mot penicillin G og cefalotin. Det er mulig at disse antibiotika har best effekt mot gram-positive bakterier. En av årsakene til dette kan være at de fleste marine bakterier er gram-negative. Dermed er det mulig at disse typene antibiotika har lite effekt mot bakteriene vi hadde påvist. Det har vist seg at forskjellige *Pseudoalteromonas* arter viser ulik resistens mot penicillin G. Noen arter har vist seg å være resistente, mens andre er følsomme. Dette betyr at penicillin G vil virke mot flere av artene, selv om de er gram-negativ. Siden det ikke finnes informasjon om resistens for de artene vi har påvist, kan vi ikke avgjøre om disse har en naturlig resistens eller ikke. Det er fortsatt mulighet for at resistensen skyldes menneskelig påvirkning.

Colwellia aestuarii har vist seg å være følsom mot penicillin G og cefalotin ut fra teoridelen. Den har også vist resistens mot tetrasyklin. Resultatet vårt viser at *C. Aestuarii* er resistent mot penicillin G (tabell 11). Gjennomsnittet for cefalotin og tetrasyklin (doksycylin) er litt lavere enn gjennomsnittet for alle områdene (tabell 16), og enda lavere om sonene for Alnes blir sammenlignet (tabell 14). Det er mulig at denne bakterien er påvirket av miljøet, ettersom den viser resistens mot penicillin G, noe den ikke har gjort i andre forsøk. Prøven ikke er tatt fra utslippsområdet ved Åse renseanlegg. Dette kan bety at påvirkning fra antibiotika eller resistente organismer kan oppstå i områder med mindre og annen type utslipp. Alnes og Flø har mindre befolkningstetthet i forhold til Åse, og ingen utslipp fra sykehus. Utslipp i disse områdene kan fortsatt føre til påvirkning av bakteriene i miljøet. Det er stor sannsynlighet for antibiotika i alle utslipp, siden det er et vanlig medikament i husholdninger og landbruk.

Flavobacterium frigidarium har vist seg å være følsom mot tetrasykliner, og resistent mot penicillin G, ifølge teorien. Dette stemmer med resultatet vårt som viser resistens mot penicillin G, og følsomhet mot doksycylin (28 mm sone). Sonen for doksycylin er

fortsatt mindre enn gjennomsnittet for alle områdene (tabell 16) og Flø (tabell 13). Resultatet vårt viste også resistens mot trimetoprim/sulfa. Det er ikke kjent om bakterien har en naturlig resistens for dette, men siden denne type antibiotika vanligvis er aktiv mot gram-negative stavbakterier, kan det bety at resistensen ikke har en naturlig opprinnelse. Bruken av trimetoprim/sulfa har gått ned de siste årene (tabell 3), noe som vil bety at det vil bli mindre av den i miljøet, og mindre sjanse for å påvirke organismer i miljøet.

Pseudomonas fluorescens er følsom mot tetrasykliner og resistent mot smalspektrede cefalotiner, ifølge teorien. Dette stemmer med resultatet da den viser følsomhet mot doksykyklin, og resistens mot cefalotin. Den viser også resistens mot penicillin G. Dette kan komme av at den er gram-negativ, og slektninger som *Pseudomonas aeruginosa* har naturlig resistens mot mange forskjellige antibiotika. Den genetiske likheten var på 99% mellom prøven og *P. fluorescens*. Dette kan skyldes feil ved sekvensering, eller at den er en annen art med genetisk likhet til *P. fluorescens*.

De samlede resultatene kan ikke konkludere hvordan resistensen har oppstått, men viser en forskjell på mengde resistens basert på område. Det kan være at andre resistente bakterier fra utslippet hjelper i å opprettholde et resistent miljø, da tarmbakterier kan overføre R-plasmid selv om de ikke kan danne kolonier eller påvises. VNSS mediet er selektivt for marine bakterier, og tar dermed ikke hensyn til eventuelle tarmbakterier som måtte finnes i prøvene. Forskjellen på områdene viser allikevel at det er stor sannsynlighet for at utslippet påvirker bakteriene i miljøet. Dette kan være fordi naturlige resistente bakterier favoriseres, genetisk mutasjon, overføring av gen, eller en kombinasjon av disse mulighetene.

Etter å ha jobbet med denne problemstillingen, ser vi nå at i et miljø der antibiotika er tilstede, vil naturlig og eventuell ervervet (unaturlig) resistens være knyttet sammen. Dette fordi antibiotika i et miljø over tid, uansett vil selektere frem unaturlig resistens (3, 22). Det første som skjer vil sannsynligvis være at naturlig resistente bakterier vil favoriseres, og over tid vil ikke resistente bakterier i miljøer utvikle resistens. Påvisning av naturlig eller unaturlig resistens vil derfor kunne beskrive omfanget av problemet, eller hvor langt utviklingen har kommet. Teoretisk sett er det sannsynlig at dersom en har et område med mye tilstedeværelse av antibiotika vil prøver vise høyere resistens enn områder uten antibiotika tilstede. Det er dette resultatet vårt tyder på. Resultatet vårt stemmer derfor

overens med tidligere forskning på resistensutvikling som sier at hyppigheten av antibiotika resistens er proporsjonal med bruken av antibiotika (3, 22).

5.4 Sammenligning av resultat fra tidligere oppgave

Når man sammenligner gjennomsnittet for våre prøver (tabell 15) med gjennomsnittet til den andre oppgaven (vedlegg 1), ser man at deres prøver hadde et lavere gjennomsnitt for doksysykin, trimetoprim/sulfa og ciprofloksacin. Penicillin G og cefalotin har ganske like verdier. Det er usikkert hva som er årsaken bak denne forskjellen, men det kan være at prøvene ikke ble tatt på de helt samme områdene. Prøvene våre er fra strand sediment, mens de andre prøvene er tatt både fra sediment på dypt vann og strandsone. I deres resultat viste prøvene fra strandsonen lavere soner for doksysykin, trimetoprim/sulfa og ciprofloksacin, enn prøvene fra dypt vann. Årsaken til dette er ukjent.

Det var interessant at vi fikk samme resultatet for penicillin G og cefalotin. Selv om penicillin G har liten økoskygge, kort halveringstid (9) og er ustabil i miljøet (11). Kan resultatet komme av at penicillin G er et mye brukt antibiotika (tabell 2). Cefalotin har kort halveringstid, men er sterkt resistensdrivende (9). Den resistensdrivende egenskapen kan være grunnen til at det forekom mye resistens.

5.5 Konsekvenser

Tilstedeværelse av antibiotika kan forårsake et problem i miljøet ved at bakteriemangfoldet blir innskrenket. Dette kan gjøre at bakteriene som overlever vil ta opp større plass i miljøet og en vil få en ubalanse i den normale bakterieflora. Dette kan igjen få konsekvenser for andre organismer i miljøet som er avhengige av disse bakteriene, slik at det kan oppstå en kjedereaksjon av negativ påvirkning i miljøet.

Det er nevnt i teorien at noen *Pseudoalteromonas* arter er opportunistisk patogen for marine dyr inkludert fisk og krepsdyr. Dette kan igjen føre til resistens problemer i oppdrettsnæringen. Dermed må det benyttes midler som er mer bredspektrede og har større

negativ påvirkning av miljøet. I dag er resistente bakterier i kylling et stort tema. Det kan tenkes at dersom problemet blir stort nok i oppdrettsnæringen kan lignende forhold også forekomme der. Som skrevet i teorien er *Pseudomonas fluorescens* en opportunistisk patogen som kan forårsake sykdom hos mennesker og dyr. Utvikling av resistens hos *P. Fluorescens* kan da få negative konsekvenser ved at eventuelle sykdomstilfeller forårsaket av denne bakterien vil bli vanskeligere å behandle. Det er også mulig at den kan overføre resistens gen til *Pseudomonas aeruginosa* som er nært beslektet. Dette vil være svært negativt da *P. aeruginosa* er en bakterie som har mye naturlig resistens og derfor kan bli vanskelig å behandle (2, 39).

6. Konklusjon

Vi konkluderer med at det er økt antibiotikaresistens hos marine bakterier ved Åse renseanlegg i forhold til referanseområdene. Det er derfor stor sannsynlighet for denne resistensen skyldes påvirkning av utslippet. Dette kan skyldes at naturlige resistente bakterier favoriseres, genetisk mutasjon, overføring av gen eller en kombinasjon av disse mulighetene.

Resistensutvikling hos marine bakterier på grunn av antibiotika i utslipp kan gi konsekvenser for økosystemet i Borgundfjorden, fiskeoppdrett, sjømat og helse.

For å trekke en sterkere konklusjon oppfordrer vi til videre forskning hvor et større antall prøver blir tatt i en gradient fra utslipps området. Ved å antibiotika teste bakterier i disse prøvene og se på hvordan avstand fra utslippsområdet påvirker resistensutvikling kan en se på hvordan de påvirkes av utslippet.

For at det skal være mulig å si om resistens i området er naturlig eller ikke må resistensprofil til noen av de vanligste marine bakteriene være kartlagt.

Dette kan gjøres ved å identifisere bakteriene i tillegg til å antibiotika teste dem og slik kartlegge resistensprofil for disse marine bakteriene. Dette ved å sammenligne resistens ved utslipps området i forhold til resistens/sensitivitet i prøver langt borte fra utslippsområdet. Det er også mulig å sekvensere eventuelle resistens gen, og slik finne ut om resistensen er naturlig eller påvirket. Slik kartlegging vil være til stor hjelp for videre forskning på området.

7. Referanser

1. Bitton G. Wastewater microbiology. 4th ed. ed. Hoboken, N.J: Wiley-Blackwell; 2011.
2. Sundsfjord A, Simonsen GS, Haldorsen B, Lundblad EW, Samuelsen Ø. Bredspektrede betalaktamaser hos gramnegative stavbakterier08.2008:[5 p.].
3. Høiby EA, Vestrheim DF, Caugant DA, Gammelsrud KW. Bakteriell resistens mot antibiotika2008:[5 p.].
4. Berild D, Haug JB. Fornuftig bruk av antibiotika i sykehus2008; 128(20-23):[2335-9 pp.].
5. Hakvåg S, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet . Institutt for bioteknologi. Antibiotic-producing bacteria from the sea surface microlayer in the Trondheim Fjord, Norway. Trondheim: Norwegian University of Science and Technology, Faculty of Natural Sciences and Technology, Department of Biotechnology; 2009.
6. Stahl DA, Clark DP, Brock TD, Martinko JM, Madigan MT. Brock biology of microorganisms. 13th ed. Boston, Mass.: Pearson; 2012. 1150 s. p.
7. Maier RM, Pepper IL, Gerba CP. Environmental microbiology. 2nd ed. Amsterdam Boston: Elsevier Academic Press; 2009. XXII, 598 s. p.
8. Brandi L, Pon CL, Fabbretti A, Gualerzi CO. Antibiotics : targets, mechanisms and resistance. Weinheim: Wiley-VCH; 2014. XXIV, 549 s. p.
9. Norsk Legemiddelhåndbok Norsk Legemiddelhåndbok: Foreningen for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok; [updated 11.08.2014; cited 2013 15.06]. Available from: [www.http://legemiddelhandboka.no/](http://legemiddelhandboka.no/).
10. Kümmerer K. Significance of antibiotics in the environment. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2003;52(1):5-7.
11. Lippe EVD. Dosering av antibiotika ved nedsatt nyrefunksjon. Tidsskrift for Den norske legeförening. 2002;25-20(122):2461 – 3.
12. Schlabach M. Environmental screening of selected organic compounds 2008 : human and hospital-use pharmaceuticals, aquaculture medicines and personal care products. Kjeller: Norsk institutt for luftforskning; 2009.
13. Norheim B, Ødegaard H, Norsk Vann BA. Vann- og avløpsteknikk. 2. utg. ed. [Hamar]: Norsk Vann; 2014. 664 s. p.
14. Díaz-Cruz MS, López de Alda MaJ, Barceló D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. Trends in Analytical Chemistry. 2003;22(6):340-51.
15. Haddad T, Baginska E, Kümmerer K. Transformation products of antibiotic and cytostatic drugs in the aquatic cycle that result from effluent treatment and abiotic/ biotic reactions in the environment: An increasing challenge calling for higher emphasis on measures at the beginning of the pipe. Water Research. 2015;72:75-126.
16. Vasconcelos TG, Henriques DM, König A, Martins AF, Kümmerer K. Photo-degradation of the antimicrobial ciprofloxacin at high pH: Identification and biodegradability assessment of the primary by-products. Chemosphere. 2009;76(4):487-93.
17. Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E. Pharmaceutically active compounds in sludge stabilization treatments: Anaerobic and aerobic digestion, wastewater stabilization ponds and composting. Science of the Total Environment. 2015;503-504:97-104.

18. Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews: Microbiology*. 2007;5(3):175-86.
19. Gaustad P. Mekanismer for utvikling av antibiotikaresistente bakterier. *Tidsskr Nor Lægeforen*. 2001:3090 – 4.
20. Carlson KoL, Claes. Introduksjon till mikrobiologi -med inriktning mot naturvetare och farmaceuter. 2 ed. Studentlitteratur: Studentlitteratur; 2012. 304 p.
21. Martinez JL, Baquero F. Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000;44(7):1771-7.
22. Monnet DL, MacKenzie FM, Lopez-Lozano JM, Beyaert A, Camacho M, Wilson R, et al. Antimicrobial drug use and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, Aberdeen, 1996-2000. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(8):1432-41.
23. Chandrasekaran S, Venkatesh B, Lalithakumari D. Transfer and Expression of a Multiple Antibiotic Resistance Plasmid in Marine Bacteria. *Current Microbiology*. 1998;37(5):347-51.
24. Norm VET. NORM/NORM-VET : consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway. NORM/NORM-VET :consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in Norway.
25. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*. 2013;13(12):1057-98.
26. Dworkin M, Falkow S. *The Prokaryotes: Vol. 6: Proteobacteria: Gamma Subclass*: Springer Science & Business Media; 2006.
27. Colwell RR, Belkin S. *Oceans and health : pathogens in the marine environment*. New York: Springer; 2006.
28. Rozen Y, Belkin S. Survival of enteric bacteria in seawater. *FEMS microbiology reviews*. 2001;25(5):513-29.
29. Bowman JP. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *pseudoalteromonas*. *Mar Drugs*. 2007;5(4):220-41.
30. Al Khudary R, Stöber NI, Qoura F, Antranikian G. *Pseudoalteromonas arctica* sp. nov., an aerobic, psychrotolerant, marine bacterium isolated from Spitzbergen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2008;58(9):2018-24.
31. Romanenko LA, Zhukova NV, Rohde M, Lysenko AM, Mikhailov VV, Stackebrandt E. *Pseudoalteromonas agarivorans* sp. nov., a novel marine agarolytic bacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003;53(Pt 1):125-31.
32. Romanenko LA, Zhukova NV, Lysenko AM, Mikhailov VV, Stackebrandt E. Assignment of ‘*Alteromonas marinoglutinosa*’ NCIMB 1770 to *Pseudoalteromonas mariniglutinosa* sp. nov., nom. rev., comb. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003;53(4):1105-9.
33. Kobayashi T, Imada C, Hiraishi A, Tsujibo H, Miyamoto K, Inamori Y, et al. *Pseudoalteromonas sagamiensis* sp. nov., a marine bacterium that produces protease inhibitors. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003;53(6):1807-11.
34. .
35. Ivanova EP, Romanenko LA, Matté MH, Matté GR, Lysenko AM, Simidu U, et al. Retrieval of the species *Alteromonas tetraodonis* Simidu et al. 1990 as *Pseudoalteromonas tetraodonis* comb. nov. and emendation of description. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2001;51(3):1071-8.

36. Holmström C, James S, Neilan BA, White DC, Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas tunicata* sp. nov., a bacterium that produces antifouling agents. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1998;48(4):1205-12.
37. Egan S, Holmström C, Kjelleberg S. *Pseudoalteromonas ulvae* sp. nov., a bacterium with antifouling activities isolated from the surface of a marine alga. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2001;51(4):1499-504.
38. Scales BS, Dickson RP, LiPuma JJ, Huffnagle GB. Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014;27(4):927-48.
39. Hancock REW, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resistance Updates*. 2000;3(4):247-55.
40. Wong V, Levi K, Baddal B, Turton J, Boswell TC. Spread of *Pseudomonas fluorescens* Due to Contaminated Drinking Water in a Bone Marrow Transplant Unit. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011;49(6):2093-6.
41. Groudieva T, Grote R, Antranikian G. *Psychromonas arctica* sp. nov., a novel psychrotolerant, biofilm-forming bacterium isolated from Spitzbergen. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2003;53(Pt 2):539-45.
42. Wang FQ, Lin XZ, Chen GJ, Du ZJ. *Colwellia arctica* sp nov., isolated from Arctic marine sediment. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2015;107(3):723-9.
43. Humphry DR, George A, Black GW, Cummings SP. *Flavobacterium frigidarium* sp. nov., an aerobic, psychrophilic, xylanolytic and laminarinolytic bacterium from Antarctica. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2001;51(Pt 4):1235-43.
44. Buddies S. Interpreting Plates http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/MicroBio_Interpreting_Plates.shtml [cited 2015 26.05].

Vedlegg 1

(Da bacheloroppgaven som vår oppgave bygger på var for stor til å ha med som vedlegg i tillegg til at den kun finnes i papirformat, har vi valgt å ta med relevante deler av den som vedlegg).

«Resistensutvikling hos marine bakterier i Borgundfjorden.»

Sammendrag

Rester av antibiotika samt antibiotika resistente bakterier siver ut i miljøet fra humane og animalske kilder. Avløpsvann er en stor kilde til denne type forurensning. Gjennom evolusjon har bakterier utviklet en fantastisk evne til å tilpasse seg miljøet og genmaterialet spres raskt. Resistensutvikling i miljøet er en konsekvens av disse kombinasjonene.

I dette studiet har vi testet marine bakterier for resistensutvikling på fem forskjellige antibiotika typer, valgt ut fra forbruket i Ålesund kommune. Hoved lokaliteten Åse avløpsrenseanlegg ble sammenlignet med en referanselokalitet, Gangstøvika, som ligger i et annet fjordsystem og er ikke påvirket av de samme miljøforurensningene.

Resultatene har vist hemningssoner i stor variasjon. Prøvene fra hoved lokalitet har samsvart med forventet resultat der flere av hemningssonene har vist liten påvirkning av gitt antibiotikum samt mulig resistensutvikling. Sammenligningen med referanselokalitet har derimot ikke samsvart med forventet resultat. Dette kan bety at forurensning av antibiotika er av større grad en først antatt. Det kan også være feilkilder underveis som påvirker dette resultatet.

Prøvetakning.



Bildet viser hvor prøvene i den tidligere bacheloroppgaven «Resistensutvikling hos marine bakterier i Borgundfjorden ble tatt. Første prøvetakning den 28. feb. 2014 var kun fra strandsonen på 2 ulike steder (beskrevet nedenfor). Andre prøvetakning den 18. mars 2014 var grabb og vannprøver tatt ut fra land (beskrevet nedenfor). Prøver merket med F er fra første prøvetakning og prøver merket med A er fra andre prøvetakning.

Beskrivelse av prøver fra strandsonen:

Prøvene ble tatt langs strandsonen ved fjære for å få tilgang til bakterier som tidvis er dekket av vann. Prøvene ble tatt ca. 150 og 300 m vest for renseanlegget. (Dyrket samme dag).

Beskrivelse av vann og grabb prøver:

2A- Liten filtrering fra bunnsediment, 30 m dypt og 50 m fra utløpsrør.

4A- Stor filtrering fra bunnsediment, 30 m dyp og 50 m fra utløpsrør.

6A- Bunnvann fra grabb.

7A- Vann ved røret, tatt med grabb.

8A og 9A- Overflatevann ved rør.

12A- Treverk ved rør på 27 m dyp.

13A- Bunnstein, 30 m dyp, 100 m fra rør.

17A og 18A- Utstryk bunnstein ved rør.

Prøvelokalitet var så nær opp til utløpsrøret som mulig, og en kort gradient ut fra dette i retning mot vest. Utløpsrøret ligger på ca. 30 m dyp. Grabbprøven med bunnssubstrat tatt 50 m fra røret og på 30 m dyp, ble filtrert i en flerlagssil, og ført over på to autoklaverte flasker. (Dyrket samme dag).

Resultat.

Tabell:

Tabellen viser resultatet fra tidligere bacheloroppgave «Resistensutvikling hos marine bakterier i Borgundfjorden». Vi har satt deres resultat inn i denne tabellen og regnet ut gjennomsnittet da de ikke hadde regnet det ut. Prøver merket med F er fra første prøvetakning og prøver merket med A er fra andre prøvetakning.

Prøve nr.	PENG1	CEP30	DOX30	SxT25	CIPR5
1F	14	10	16	18	10
2F	0	0	6	36	24
3F	16	6	16	8	8
4F	0	0	30	40	30
5F Vannprøve	18	10	30	30	28
6F Vannprøve	8	0	10	20	26
2A	0	8	11	13	13
4A	0	0	17	37	18
6A	8	8	18	31	22
7A	8	8	30	19	23
8A	6	5	11	19	23
9A	6	13	17	24	21
12A	12	11	11	15	31
13A	10	18	18	23	25
17A	0	7	8	21	21
18A	16	9	12	32	26
Gjennomsnitt	7,625	7,0625	16,3125	24,125	21,8125

Vedlegg 2

Tillaging av NSS og VNSS

NSS : «Kunstig Sjøvann», Nine saltsolution.

VNSS : NSS tilsatt næringstoffer, dyrkningsmedie for marine bakterier. Kan lages både med og uten agar. Dersom agar tilsettes benyttes 1,5% (15g/1000ml).

Stamløsninger (lag disse til først)

	Stoff	K-nr	Mengde stoff/ionefritt vann
1.	NaHCO ₃	N-125	0,8g/1000ml
2.	KBr	K-124	0,4g/1000ml
3.	SrCl ₂ x 6H ₂ O	S-139	0,8g/1000ml
4.	FeSO ₄ x 7H ₂ O	B-139	1,0g/100ml (denne er Ikke holdbar, så må lage ny for hver gang)
5.	Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	J-109	1,0g/100ml
6.	H ₃ BO ₃	N-124	1,0g/100ml

Alle tillages med ionefritt vann (Grad I).

Oppskrift på NSS- 1000ml sluttvolum (bruk målekolbe).

Start med å fylle 700 ml dH₂O (Grad II) i et 1000ml begerglass med magnetrører. Deretter tilsett følgende volum av følgende stamløsninger:

	K-nr	1000ml	6000ml
NaHCO ₃		100ml	600ml
KBr		100ml	600ml
SrCl ₂ x 6H ₂ O		10ml	60ml
H ₃ BO ₃		10ml	60ml
NaCl	N-106	17,60g	105,6g
Na ₂ SO ₄	N-142	1,47g	8,82g
KCl	K-139	0,25g	1,5g
MgCl ₂ x 6H ₂ O	M-105	1,87g	11,22g
CaCl ₂ x 2H ₂ O	K-165	0,41g	2,46g

-Gang opp mengde om andre volum er ønsket.

Når alle kjemikaliene er justeres pH til 7,0 med ca. 0,9 ml per 1000ml 0,1M HCl (dråpevis). Husk å kalibrere pH-meteret først.

Volumet justeres tilslutt til 1000ml vha en målekolbe. Bland godt før løsningen fordeles 500ml autoklaveflasker, 250ml i hver. Løsningen autoklaveres på vanlig måte, 121°C i 15 minutter.

VNSS-flytende dyrkningsmedium

	K-nr	Mengde
NSS, pH 7,0		1000ml
Peptone	P-136	1,0 g
Gjærekstrakt	Y-101	0,5 g
Glukose	G-101	0,8 g
FeSO ₄ x 7H ₂ O		1,0 ml
Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O		1,0 ml

-Gang opp mengde om andre volum er ønsket.

Mediet autoklaveres slik som NSS, evt. fordelt i dyrkningskolber.

VNSS-agarmedium

VNSS flytende medium tilsettes 15 g agar pr. 1000 ml i en erlenmeyerkolbe. Bruk 2000ml kolbe til 1000 ml medium. Autoklaveres på vanlig måte. Det trengs ikke å koke opp mediet før autoklaving slik som de fleste «ferdigkjøpte mediene». Etter autoklaving kjøles agaren ned til ca. 60°C før den helles på sterile petriskåler.

Vedlegg 3

4.2 RESISTENSBESTEMMELSE

4.2.1 Hensikt

Brukes for å velge et virksomt antibiotikum for behandling av en infeksjon.

4.2.2 Prinsipp

Når en bakterie resistensbestemmes testes mikroorganismen mot ulike typer antibiotika for å bestemme Minimum Inhibition Concentration (MIC-verdien). For å bestemme MIC-verdi ved agardiffusjon trengs det en referanse (regresjonskurve) som viser sammenhengen mellom hemningszone og MIC. Referansemetoder for MIC-bestemmelse er agarfortynning- eller rørfortynningsmetode.

Ved agardiffusjonsmetoden inokuleres agaroverflaten med en jevn suspensjon av bakterier. Tykkelsen av inokulatet er standardisert. På agaren settes det tabletter eller lapper innsatt med et antibiotikum. Dette diffunderer ut i kulturmediet slik at konsentrasjonen av antibiotika avtar med økende avstand fra lappen eller tablett (diameter \approx log konsentrasjon). Etter inkubering dannes det en sone uten bakteriekolonier; hemningszone. Der bakteriene har vokst til synlig kolonistørrelse er konsentrasjonen av antibiotika tilnærmet like MIC-verdien.

4.2.3 Utstyr og reagens

- Steril fysiologisk saltvann (hvit kork)
- Øser
- Skåler til resistensbestemmelse
- Antibiotikatabletter
- Vattpinne
- Densimeter

4.2.4 Fremgangsmåte

a) Ved bruk av Rotasjonsmetode:

1. Slem opp 5-6 kolonier i 5 ml sterilt saltvann (hvit kork) tilsvarende 0,5 Mc Farland med en pipette. Bland godt.
2. Dypp en steril vattpinne i glasset og appliser på skålen, fra ytterst og innover på utsedmaskinen (densimeteret). Se film av utsåing på CD.
3. La skålen tørke (10-15 minutt)
4. Tilsett aktuelle antibiotika-tabletter ved hjelp av dispenser.
5. La skålen stå til pre-inkubering i 15 minutter
6. Inkuber skålen i 18-24 timer ved 37 °C

b) Ved bruk av Flytmetode:

1. Slem opp 5-6 kolonier i 5 ml sterilt saltvann (hvit kork) tilsvarende 0,5 Mc Farland med en pipette. Bland godt.

2. Ved resistensbestemmelse av *Enterobacteriaceae* og *Pseudomonas* tømmes pipetten helt. Bruk pipetten i et nytt 5 ml sterilt saltvannsglass
3. Ved resistensbestemmelse av *Staphylococcus* overføres 1 dråpe til et nytt 5 ml sterilt saltvannsglass
4. Ved resistensbestemmelse av *Streptococcus* og *Hemophilus* overføres 3 dråper til et nytt 5 ml sterilt saltvannsglass
5. Øvrige bakterier, overfør 1 dråpe av oppslemmingen til et nytt sterilt saltvannsglass, bland godt
6. Pipetter over resistensskål til all agar er dekket og sug opp overskytende væske
7. La skålen tørke (10-15 minutt)
8. Tilsett aktuelle antibiotika-tabletter ved hjelp av dispenser
9. La skålen stå til pre-inkubering i 15 minutter
10. Inkuber skålen i 18-24 timer ved 37 °C

4.2.5 Avlesning

Hemmingssonen leses av som følgende: Måling av diameter av sonen uten bakterievekst rundt antibiotikatabletten. Hemningssonene korreleres med resistenstabellene, avhengige av bakterie genus.

Vedlegg 4

Protocol: Pretreatment for Gram-Negative Bacteria

This protocol is designed for purification of total DNA from Gram-negative bacteria, such as *E. coli*. The protocol describes the preliminary harvesting of bacteria before DNA purification.

Important points before starting

- See "Quantification of starting material", page 17, for details of how to collect and store samples, and how to determine the number of cells in a bacterial culture.
- This pretreatment protocol has not been thoroughly tested and optimized for high-throughput DNA purification using the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit. As a general guideline, we recommend to decrease the amount of starting material when using this protocol with the DNeasy 96 Blood & Tissue Kit.

Procedure

1. Harvest cells (maximum 2×10^9 cells) in a microcentrifuge tube by centrifuging for 10 min at $5000 \times g$ (7500 rpm). Discard supernatant.
2. Resuspend pellet in 180 μ l Buffer ATL.
3. Continue with step 2 of the protocol "Purification of Total DNA from Animal Tissues (Spin-Column Protocol)", page 29.

We strongly recommend to cut the tissue into small pieces to enable more efficient lysis. If desired, lysis time can be reduced by grinding the sample in liquid nitrogen* before addition of Buffer ATL and proteinase K. Alternatively, tissue samples can be effectively disrupted before proteinase K digestion using a rotor–stator homogenizer, such as the QIAGEN TissueRuptor, or a bead mill, such as the QIAGEN Tissuelyser (see page 56 for ordering information). A supplementary protocol for simultaneous disruption of up to 48 tissue samples using the Tissuelyser can be obtained by contacting QIAGEN Technical Services (see back cover).

For rodent tails, a maximum of 1.2 cm (mouse) or 0.6 cm (rat) tail should be used. When purifying DNA from the tail of an adult mouse or rat, it is recommended to use only 0.4–0.6 cm.

- 2. Add 20 μ l proteinase K. Mix thoroughly by vortexing, and incubate at 56°C until the tissue is completely lysed. Vortex occasionally during incubation to disperse the sample, or place in a thermomixer, shaking water bath, or on a rocking platform.**

Lysis time varies depending on the type of tissue processed. Lysis is usually complete in 1–3 h or, for rodent tails, 6–8 h. If it is more convenient, samples can be lysed overnight; this will not affect them adversely.

After incubation the lysate may appear viscous, but should not be gelatinous as it may clog the DNeasy Mini spin column. If the lysate appears very gelatinous, see the “Troubleshooting Guide”, page 47, for recommendations.

Optional: If RNA-free genomic DNA is required, add 4 μ l RNase A (100 mg/ml), mix by vortexing, and incubate for 2 min at room temperature before continuing with step 3.

Transcriptionally active tissues such as liver and kidney contain high levels of RNA, which will copurify with genomic DNA. For tissues that contain low levels of RNA, such as rodent tails, or if residual RNA is not a concern, RNase A digestion is not necessary.

- 3. Vortex for 15 s. Add 200 μ l Buffer AL to the sample, and mix thoroughly by vortexing. Then add 200 μ l ethanol (96–100%), and mix again thoroughly by vortexing.**

It is essential that the sample, Buffer AL, and ethanol are mixed immediately and thoroughly by vortexing or pipetting to yield a homogeneous solution. Buffer AL and ethanol can be premixed and added together in one step to save time when processing multiple samples.

* When working with chemicals, always wear a suitable lab coat, disposable gloves, and protective goggles. For more information, consult the appropriate material safety data sheets (MSDSs), available from the product supplier.

A white precipitate may form on addition of Buffer AL and ethanol. This precipitate does not interfere with the DNeasy procedure. Some tissue types (e.g., spleen, lung) may form a gelatinous lysate after addition of Buffer AL and ethanol. In this case, vigorously shaking or vortexing the preparation is recommended.

4. Pipet the mixture from step 3 (including any precipitate) into the DNeasy Mini spin column placed in a 2 ml collection tube (provided). Centrifuge at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) for 1 min. Discard flow-through and collection tube.*
5. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW1, and centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Discard flow-through and collection tube.*
6. Place the DNeasy Mini spin column in a new 2 ml collection tube (provided), add 500 μ l Buffer AW2, and centrifuge for 3 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm) to dry the DNeasy membrane. Discard flow-through and collection tube.

It is important to dry the membrane of the DNeasy Mini spin column, since residual ethanol may interfere with subsequent reactions. This centrifugation step ensures that no residual ethanol will be carried over during the following elution.

Following the centrifugation step, remove the DNeasy Mini spin column carefully so that the column does not come into contact with the flow-through, since this will result in carryover of ethanol. If carryover of ethanol occurs, empty the collection tube, then reuse it in another centrifugation for 1 min at $20,000 \times g$ (14,000 rpm).

7. Place the DNeasy Mini spin column in a clean 1.5 ml or 2 ml microcentrifuge tube (not provided), and pipet 200 μ l Buffer AE directly onto the DNeasy membrane. Incubate at room temperature for 1 min, and then centrifuge for 1 min at $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm) to elute.

Elution with 100 μ l (instead of 200 μ l) increases the final DNA concentration in the eluate, but also decreases the overall DNA yield (see Figure 2, page 21).

8. **Recommended:** For maximum DNA yield, repeat elution once as described in step 7.

This step leads to increased overall DNA yield.

A new microcentrifuge tube can be used for the second elution step to prevent dilution of the first eluate. Alternatively, to combine the eluates, the microcentrifuge tube from step 7 can be reused for the second elution step.

Note: Do not elute more than 200 μ l into a 1.5 ml microcentrifuge tube because the DNeasy Mini spin column will come into contact with the eluate.

* Flow-through contains Buffer AL or Buffer AW1 and is therefore not compatible with bleach. See page 8 for safety information.

Vedlegg 5

PROSEDYRE:

AKT 0005 16S rDNA amplifisering av mikroorganismer i komplekse miljø

1. Formål

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre 16S rDNA amplifisering av mikroorganismer i komplekse miljø

2. Omfang

Prosedurens omfatter 2 trinn av amplifisering av 16s rDNA fragmenter som skal brukes videre til DGGE analyse prosedyre nummer AKT0010

3. Bakgrunnsinformasjon

16S rDNA er det molekylet som i størst grad har blitt benyttet til studier og består av flere områder med svært konserverte sekvenser godt egnet for sekvenssammenstilling.

Molekylene har også variable områder hvor noen er spesifikke for hver art. De variable områdene har gjort det mulig å identifisere organismer som ikke tidligere har vært dyrket ved hjelp av molekylærbiologiske metoder. Hver strand av mål-DNAet fungerer som en mal for DNA-syntese.

Sammen med DNAet har man en løsning som inneholder de fire nukleotidene, til tillaging av nytt DNA og enzymet DNA-polymerase, som katalyserer syntesen. I tillegg inneholder løsningen primere, som er korte biter av nukleinsyre, som skal starte reaksjonen. I første steg vil DNA-dobbeltrådene bli denaturert til enkelttråder ved hjelp av varme, ca. 94 °C. Deretter blir blandingen avkjølt til ca. 55 °C og primere, som man har i overflod, vil da feste seg til sine komplementære sekvenser. Når primerne er festet vil polymerasen virke slik at det blir syntetisert to nye DNA-tråder ved at primerne flytter seg mot 5' enden og deoxynukleotider vil bli festet i komplementær rekkefølge. Etter dette vil maskinen begynne på steg 1 igjen, og den vil foreta mellom 35 og 45 slike sykluser. Nå vil altså dobbelt så mange DNA-tråder bli denaturert og vi vil få dannet dobbelt så mange nye tråder hvis effekten til hver syklus fungerer optimalt. Effektiviteten avhenger av primerne,

syklus-temperaturene og tilstedeværelse eller fravær av polymerase-hemmere. Mot slutten av syklusene vil dannelsen av produkt flate ut enten på grunn av at komponentene er oppbrukt eller på grunn av at til slutt vil det være et så høyt antall produkt at de vil festes til hverandre istedenfor til primere og vi vil ikke få dannet flere tråder.

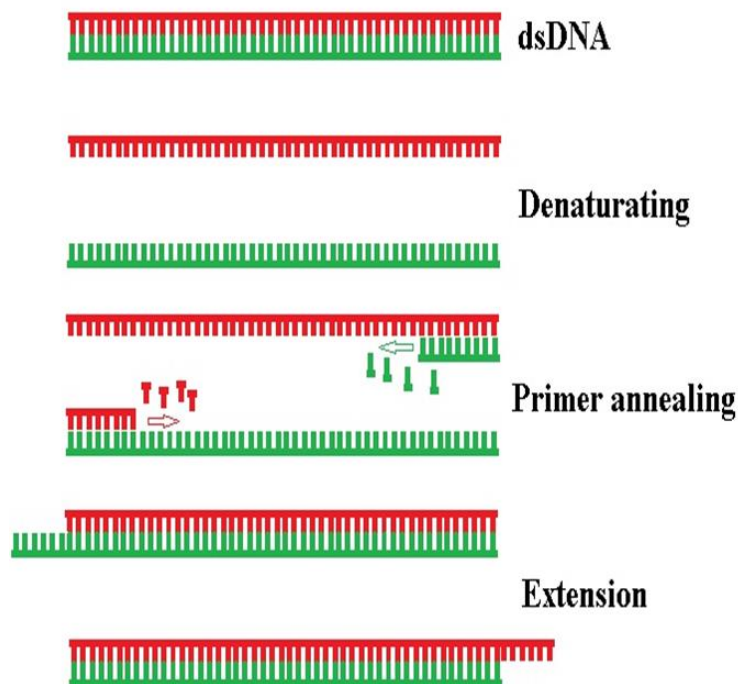
Deteksjon. Produktene må detekteres og det finnes flere metoder å gjøre dette på. Enten detekteres produktene etter at de er dannet (elektroforese) eller samtidig som de blir dannet, altså real-time PCR (qPCR). Her blir DNA merket med et fluorescerende fargestoff, slik at nivåene av fluorescens kan måles etter hver PCR-syklus.

4. Utstyr og reagenser

Mastermix:	kons:
PCR mastermix	2X
primer - fwd	10 pmol/μl
rwd - rwd	10 pmol/μl
MgCl ₂	25mM
ddH ₂ O	

5. Analyseprinsipp

PCR



6. Kvalitetskontroll

Analysen skal kvalitetssikres ved bruk av ren dyrket bakterie kultur som positiv kontroll og negativ kontroll bestående av ddH₂O tilsatt reaksjonsmiksen for å kontrollere at ikke miksen er forurenset eller danner interne bindinger.

7. Prøvemateriale

Prøvematerialet skal være rensed DNA etter protokoll AKT0002 eller AKT 0003. Prøvene skal oppbevares ved -20° C

8. Arbeidsbeskrivelse

Tabell for tillaging av mastermiks:

Komponent	Start konsentrasjon	Per reaksjon	Mastermiks (for totalt antall prøver)	Konsentrasjon i løsning
Polymerase	2x	5µL		1x
Primer fwd (5')	10µM	0,5µL		0,5µM
Primer rwd (3')	10µM	0,5µL		0,5µM
ddH ₂ O	nukleasefritt	2,8µL		-

2. Fordel 8µL mastermiks til hvert PCR rør, mastermiksen holdes avkjølt ved å plassere stativet på en boks med is under pipettering.

3. Til sett 2µL templat DNA til hvert rør på en qPCR plate. Husk å merke godt hvilket templat DNA som tilsettes i hvert rør. IKKE TIL NEGATIV KONTROLL.

4. Negativ kontroll skal kun bestå av mastermiks som en intern kontroll på at ikke mastermiksen har blitt forurenset av DNA.

5. Vortex lett og spinn med på plate- sentrifuge

6. Settes i analyse maskin og følgende PCR program benyttes:

Reaksjon	Temperatur	Tid	Antall sykluser
Innledende denaturering	95°C	10 minutter	1 syklus

Denaturering	95°C	30 sekunder	} 40 sykluser
Annealing Elongation	58°C 72°C	30 sekunder 60 sekunder	
Elongation	72°C	10 minutter	1 syklus

9. Feilkilder

Forurensing av mastermiks
Denaturert DNA
Lav enzymaktivitet

10. Resultatvurdering

Resultater vurderes ved bruk av gel elektroforese protokoll AKT 00xx. Positive prøver skal ha korrekt vandringslengde basert på standard prøve og både negativ og positiv kontroll må være gyldige.

Vedlegg 6

PROSEDYRE:

AKT 00015 Agarose gel farget med GelRed™

1. Formål

Hensikten med prosedyren er å standardisere og kvalitetssikre deteksjon av PCR produkter med 2% agarosegel farget med GelRed™

2. Omfang

Proseduren gjelder for PCR produkt amplifisert ved HiÅ PCR lab.

3. Bakgrunnsinformasjon

Biokjemisk teknikk som benytter elektriskfelt til å separere organiske molekyler, skille i hovedsak DNA fragmenter på størrelse

Det finnes to hovedtyper av gelmateriale som brukes ved separasjon av DNA: polyakrylamid og agarose.

Agarose er et polysakkarid som er isolert fra alger. For å skille store DNA-fragmenter brukes lav konsentrasjon av agarose.

4. Utstyr og reagenser

Loading dye

Agarose pulver

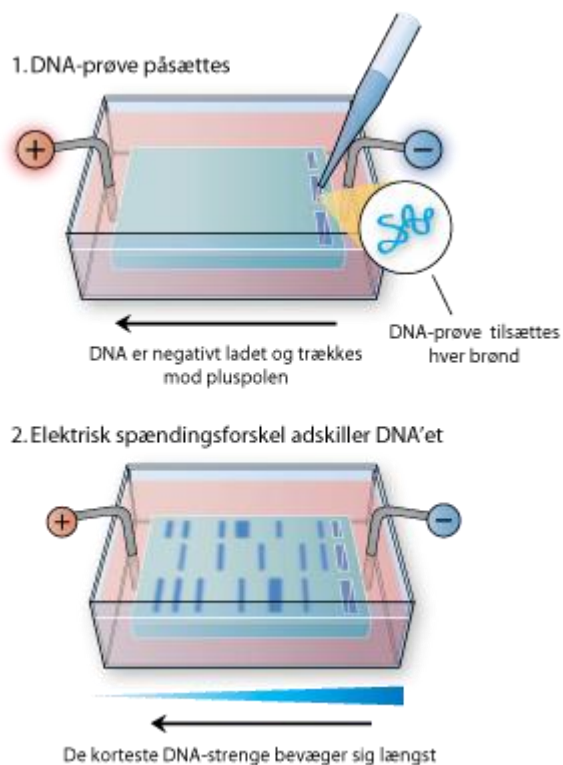
1x TAE buffer

GelRed TM

Erlendmeyer kolbe

Termometer

5. Analyseprinsipp



6. Kvalitetskontroll

Positiv og negativ kontroll fra PCR analysen

7. Prøvemateriale

PCR produkt

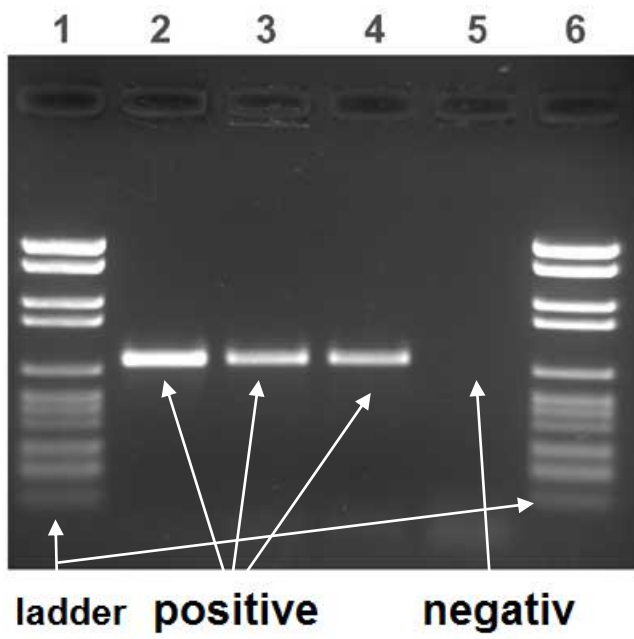
8. Arbeidsbeskrivelse

1. Vei opp: 1,8g Agarose
2. Mål opp: 80 mL 1x TAE buffer
3. Blandes i en 500mL erlenmeyerkolbe
4. Kokes ved fullstyrke i mikrobølgeovn i 2 minutter
5. Ta forsiktig ut → OBS!! Kan sprutkoke ved omrøring
6. Rør forsiktig om og sjekk at all agarose er oppløst
7. Tilsett 1,0 uL GelRed. Rør forsiktig om slik at fargestoffet fordeler seg likt i væsken
8. Kjøles ned til 65 °C
9. Overfør agarose til gelkar, sett i kammer og la stivne
10. Tilsett 1 ul loading dye (LD) til 3 ul PCR prøve.
11. 3 ul prøve tilsettes brønnene
12. La stå med spenning 45 min ved 100V
13. Overfør fra elektroforesekar til UV lampe og ta bilde

9. Feilkilder

Skjev gel
Feil buffer
Varierende spenning

10. Resultatvurdering



Vedlegg 7

ExoSAP-IT®

Product Numbers 78200/01/02/05

Brief Protocol

ExoSAP-IT treats PCR products ranging in size from less than 100 bp to over 20 kb with absolutely no sample loss by removing unused primers and nucleotides.

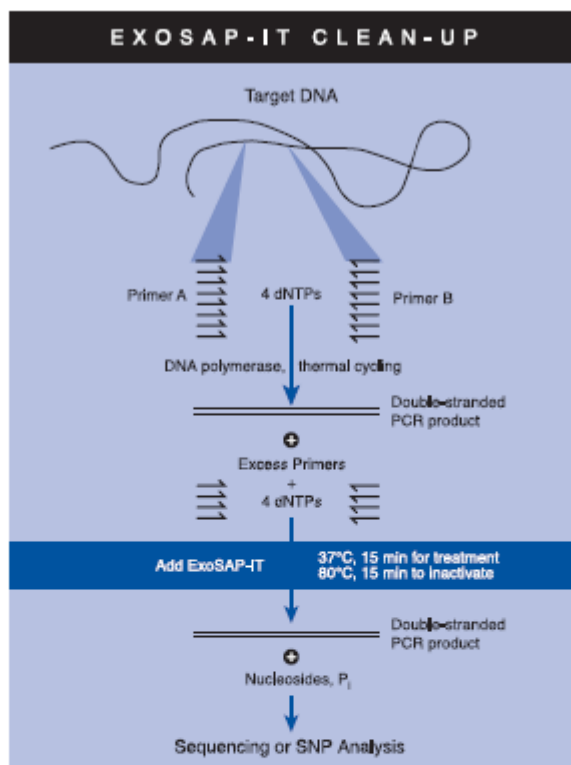
Add ExoSAP-IT directly to the reaction products following PCR. ExoSAP-IT is active in commonly used PCR buffers, so no buffer exchange is required. After treatment, ExoSAP-IT is inactivated by heating to 80°C for 15 minutes. The treated PCR products are now ready for subsequent analysis in applications that require DNA to be free of excess primers and nucleotides.

PCR Clean-Up Protocol:

1. Remove ExoSAP-IT from -20°C freezer and keep on ice throughout this procedure.
2. Mix 5 µl of a post-PCR reaction product with 2 µl of ExoSAP-IT for a combined 7 µl reaction volume.
Note: When treating PCR product volumes greater than 5 µl, simply increase the amount of ExoSAP-IT proportionally.
3. Incubate at 37°C for 15 min to degrade remaining primers and nucleotides.
4. Incubate at 80°C for 15 min to inactivate ExoSAP-IT.
5. The PCR product is now ready for use in DNA sequencing, SNP analyses, or other primer-extension applications. Treated PCR products may be stored at -20°C until required.

Note: Store ExoSAP-IT in a non-frost-free freezer.





USB, the logo design and ExoSAP-IT are registered trademarks of USB Corporation.

ExoSAP-IT and Exonuclease I/Shrimp Alkaline Phosphatase Method—These products or portions thereof are sold under license from Amersham Biosciences Corp. under U.S. Patent Nos. 5,741,676, 5,756,285 and related patents. ExoSAP-IT is covered by U.S. Patent Nos. 6,379,940 and 6,387,634.

The Polymerase Chain Reaction (PCR) is covered by patents owned by Roche Molecular Systems and F. Hoffman-La Roche Ltd.

©USB Corporation 2005—All rights reserved.

USB Corporation
26111 Miles Road, Cleveland, Ohio 44128 USA
www.usbweb.com

P-78200B
rev 08/05

Vedlegg 8

(tatt fra lab. Prosedyre i Andvendt Bioteknologi).

Arbeidsbeskrivelse

The sequencing reaction was carried out in 10 μL volumes, containing 1 μL Big Dye Terminator 3.1, 1 μL 5x Sequencing buffer (Applied Biosystems), 0.32 μL f primer (μM), 4,68 μL ddH₂O and 3 μL template DNA. Amplification was performed in a 2720 thermal cycler (Applied Biosystems) with 1 cycle of denaturation (6 min, 96^oC), followed by 25 cycles of denaturation (10 sec, 96^oC), annealing (5 sec, 50^oC), and extension (4 min, 60^oC). 10 μL ddH₂O was added to each well upon completed sequencing reaction and stored at -20^oC until sequencing.

Vedlegg 9

Resultat fra dyrkning på antibiotika

Åse

1Å1	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	0 mm	0 mm	0 mm
DOX30	16 mm	24 mm	Sensitiv
SxT25	36 mm	30 mm	28 mm
CIPR5	48 mm	44 mm	Sensitiv

2Å3	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	22 mm	30 mm	16 mm
CEP30	32 mm	30 mm	Sensitiv
DOX30	44 mm	50 mm	Sensitiv
SxT25	54 mm	50 mm	Sensitiv
CIPR5	68 mm	70 mm	Sensitiv

1Å3S	Prøve 1
PENG1	25 mm
CEP30	42 mm
DOX30	28 mm
SxT25	46 mm
CIPR5	48 mm

3Å1	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	0 mm	0 mm	0 mm
DOX30	15 mm	16 mm	27 mm
SxT25	31 mm	30 mm	27 mm
CIPR5	34 mm	34 mm	40 mm

2Å1	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3
PENG1	19 mm	26 mm	0 mm
CEP 30	Sensitiv	14 mm	0 mm
DOX30	Sensitiv	32mm	18 mm
SxT25	Sensitiv	Sensitiv	44 mm
CIPR5	Sensitiv	Sensitiv	44 mm

2Å2S	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	0 mm	0 mm	0 mm

DOX30	34 mm	30 mm	32 mm
SxT25	30 mm	25 mm	35 mm
CIPR5	27 mm	32 mm	32 mm

Å1S	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	0 mm	0 mm	0 mm
DOX30	26 mm	22 mm	27 mm
SxT25	30 mm	30 mm	25 mm
CIPR5	54 mm	52 mm	36 mm

2Å2	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	22 mm	30 mm	22 mm
CEP30	30 mm	28 mm	Sensitiv
DOX30	22 mm	26 mm	Sensitiv
SxT25	58 mm	52 mm	Sensitiv
CIPR5	44 mm	50 mm	Sensitiv

1Å3	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	30 mm	0 mm
CEP30	0 mm	46 mm	0 mm
DOX30	28 mm	26 mm	32 mm
SxT25	30 mm	44 mm	23 mm
CIPR5	50 mm	54 mm	43 mm

1Å2S	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	8 mm	18 mm	17 mm
DOX30	32 mm	30 mm	Sensitiv
SxT25	34 mm	44 mm	Sensitiv
CIPR5	54 mm	54 mm	Sensitiv

1Å2	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	0 mm	0 mm	0 mm
DOX30	26 mm	28 mm	29 mm
SxT25	46 mm	46 mm	37 mm
CIPR5	50 mm	50 mm	33 mm

Alnes

1A3	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	55 mm	23 mm	20 mm
CEP30	44 mm	36 mm	Sensitiv
DOX30	50 mm	50 mm	Sensitiv
SxT25	60 mm	52 mm	Sensitiv
CIPR5	64 mm	56 mm	Sensitiv

3A3	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	12 mm	14 mm	13 mm
DOX30	34 mm	26 mm	30 mm
SxT25	40 mm	32 mm	30 mm
CIPR5	46 mm	42 mm	44 mm

2A3	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	0 mm	18 mm	0 mm
DOX30	36 mm	44 mm	Sensitiv
SxT25	28 mm	40 mm	25 mm
CIPR5	50 mm	50 mm	Sensitiv

1A1	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	42 mm	33 mm	-
CEP30	50 mm	40 mm	-
DOX30	46 mm	46 mm	-
SxT25	44 mm	44 mm	-
CIPR5	70 mm	64 mm	-

A2S	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	25 mm	35 mm	21 mm
CEP30	56 mm	50 mm	Sensitiv
DOX30	50 mm	48 mm	Sensitiv
SxT25	60 mm	56 mm	Sensitiv
CIPR5	70 mm	60 mm	Sensitiv

3A1	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	10 mm	0 mm	0 mm
DOX30	30 mm	26 mm	23 mm
SxT25	34 mm	36 mm	35 mm
CIPR5	42 mm	52 mm	50 mm

2A1	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3
PENG1	0 mm	50 mm	0 mm

CEP30	30 mm	40 mm	27 mm
DOX30	24 mm	46 mm	28 mm
SxT25	36 mm	54 mm	32 mm
CIPR5	48 mm	84 mm	Sensitiv

A1S	Prøve 1	Prøve 2
PENG1	30 mm	60 mm
CEP30	50 mm	48 mm
DOX30	30 mm	54 mm
SxT25	58 mm	56 mm
CIPR5	66 mm	70 mm

A3S	Prøve 1 *
PENG1	17 mm
CEP30	Sensitiv
DOX30	Sensitiv
SxT25	Sensitiv
CIPR5	Sensitiv

1A3S	Prøve 1 *
PENG1	32 mm
CEP30	Sensitiv
DOX30	Sensitiv
SxT25	Sensitiv
CIPR5	Sensitiv

2A2	Prøve 1 *
PENG1	31 mm
CEP30	Sensitiv
DOX30	Sensitiv
SxT25	Sensitiv
CIPR5	Sensitiv

Flø

4F2	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	24 mm	20 mm	17 mm
CEP30	21 mm	20 mm	16 mm
DOX30	26 mm	30 mm	25 mm
SxT25	42 mm	42 mm	37 mm
CIPR5	54 mm	48 mm	Sensitiv

4F3	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	0 mm	0 mm	0 mm
DOX30	30 mm	30 mm	22 mm
SxT25	41 mm	40 mm	32 mm
CIPR5	48 mm	50 mm	33 mm

1F1S	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	28 mm	32 mm	35 mm
CEP30	36 mm	32 mm	Sensitiv
DOX30	32 mm	46 mm	Sensitiv
SxT25	28 mm	34 mm	Sensitiv
CIPR5	34 mm	35 mm	Sensitiv

1F2	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	20 mm	20 mm	0 mm
CEP30	0 mm	16 mm	0 mm
DOX30	42 mm	44 mm	Sensitiv
SxT25	42 mm	52 mm	50 mm
CIPR5	64 mm	-	Sensitiv

3F2	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	22 mm	0 mm	0 mm
CEP30	20 mm	18 mm	15 mm
DOX30	Sensitiv	28 mm	Sensitiv
SxT25	Sensitiv	40 mm	35 mm
CIPR5	Sensitiv	56 mm	Sensitiv

1F3	Prøve 1	Prøve 2
PENG1	0 mm	0 mm
CEP30	0 mm	0 mm
DOX30	26 mm	26 mm
SxT25	34 mm	34 mm
CIPR5	36 mm	40 mm

1F1	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	20 mm	24 mm	0 mm
CEP30	26 mm	22 mm	15 mm

DOX30	50 mm	46 mm	Sensitiv
SxT25	50 mm	34 mm	40 mm
CIPR5	68 mm	66 mm	Sensitiv

2F3	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	50 mm	68 mm	Sensitiv
CEP30	50 mm	50 mm	Sensitiv
DOX30	52 mm	56 mm	Sensitiv
SxT25	60 mm	70 mm	Sensitiv
CIPR5	64 mm	64 mm	Sensitiv

3F3	Prøve 1	Prøve 2	Prøve 3 *
PENG1	0 mm	0 mm	0 mm
CEP30	24 mm	26 mm	25 mm
DOX30	28 mm	28 mm	Sensitiv
SxT25	0 mm	0 mm	Sensitiv
CIPR5	32 mm	32 mm	Sensitiv

2F2	Prøve 1 *
PENG1	46 mm
CEP30	Sensitiv
DOX30	Sensitiv
SxT25	Sensitiv
CIPR5	Sensitiv

2F1	Prøve 1 *
PENG1	21 mm
CEP30	Sensitiv
DOX30	Sensitiv
SxT25	Sensitiv
CIPR5	Sensitiv

2F1S	Prøve 1 *
PENG1	20 mm
CEP30	Sensitiv
DOX30	Sensitiv
SxT25	Sensitiv
CIPR5	Sensitiv