

Marte Ramstad Holm

# Karakterisering av mikrobielt samfunn og forekomst av antibiotikaresistente *Escherichia coli* i blåskjell (*Mytilus edulis*)

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft

Veileder: Sunniva Hoel

Medveileder: Anita Nordeng Jakobsen

Mai 2023



Marte Ramstad Holm

**Karakterisering av mikrobielt samfunn  
og forekomst av antibiotikaresistente  
*Escherichia coli* i blåskjell (*Mytilus edulis*)**

Masteroppgave i Matvitenskap, teknologi og bærekraft  
Veileder: Sunniva Hoel  
Medveileder: Anita Nordeng Jakobsen  
Mai 2023

Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet  
Fakultet for naturvitenskap  
Institutt for bioteknologi og matvitenskap



Kunnskap for en bedre verden



## Sammendrag

Filterfôringsmekanismen til blåskjell fører til at partikler i miljøet rundt filtreres og oppkonsentreres, og dermed blir blåskjell ansett til å gjenspeile det mikrobielle samfunnet i det marine miljøet. Revanning av blåskjell skal sørge for å fjerne alle fekale kontaminanter i tarmen, da spesielt *Escherichia coli* brukes som indikatorbakterie av forekomsten av kloakk forurensning. Antibiotikaresistente bakterier i det marine miljøet er viktig å overvåke, da det er en risiko for utvikling og spredning av resistens blant patogene bakterier hos mennesker og dyr. Blåskjell blir sett på som en god bioindikator på overvåkingen av forekomsten av antibiotikaresistens.

Hovedmålet med masteroppgaven er å undersøke om det mikrobielle samfunnet endres som effekt av revanning, dyrkingslokasjon og sesong, men også forekomsten av antibiotikaresistente *Escherichia coli* i blåskjell. For å oppnå målet ble det benyttet dyrkingsbaserte metoder for påvisning av bakterier i blåskjell og karakterisering ved 16S rRNA sekvensering. Fylogenetisk analyse ble brukt for å konstruere et fylogenetisk tre for å se på slektskapet mellom sekvensene til isolater identifisert som *Escherichia sp.* og *E. coli*. Isolater identifisert som *E. coli* ble screenet for resistens mot et panel med 15 antibiotika for å undersøke forekomsten av antibiotikaresistens.

Resultatene viste at revanningen var effektiv ved fjerning av den fekale indikatororganismen, *E. coli*, men for de andre bakterielle parameterne ble det ikke vist noen signifikant reduksjon. Effekten av ulike dyrkingslokasjoner viste en signifikant høyere forekomst ved påvisning av totalt psykrotroft kimtall og H<sub>2</sub>S produserende bakterier ved henholdsvis indre og midtre dyrkingslokasjon. En signifikant høyere konsentrasjon av totalt psykrotroft kimtall i oktober og presumptive *Aeromonas* i mars. Diversiteten av arter ble redusert etter revanning og varierte som funksjon av dyrkingslokasjon sesong med antall arter og forekomsten av artene. Videre viste det fylogenetiske ingen tydelige grupperinger av *Escherichia sp.* og *E. coli*-isolater. Ved tesing for antibiotikaresistens ble det observert at 24 % av *E. coli*-isolatene var ESBL-produserende.

## Abstract

The filter feeding mechanism of mussels causes particles in the surrounding environment to be filtered and concentrated, and thus mussels are considered to reflect the microbial community in the marine environment. Depuration of mussels must ensure the removal of all faecal contaminants in the intestine, as *Escherichia coli* is used as an indicator bacterium of the presence of sewage contamination. Antibiotic resistant bacteria in the marine environment are important to monitor, as there is a risk of the development and spread of resistance among pathogenic bacteria in humans and animals. Mussels are a good bioindicator for monitoring the occurrence of antibiotic resistance.

The aim of the master's thesis is to investigate whether the microbial community changes as an effect of depuration, location, and season, but also the occurrence of antibiotic resistant *Escherichia coli* in mussels. To achieve the goal, culture-based methods were used for the detection of bacteria in mussels and characterization by 16S rRNA sequencing. Phylogenetic analysis was used to construct a phylogenetic tree to look at the relatedness of the sequences of isolates identified as *Escherichia sp.* and *E. coli*. Isolates identified as *E. coli* were screened for resistance to a panel of 15 antibiotics to investigate the prevalence of antibiotic resistance.

The results showed that the depuration was effective in removing the faecal indicator organism, *E. coli*, but for the other bacterial parameters no significant reduction was shown. The effect of different cultivation locations showed a significantly higher incidence when detecting total psychrotrophic counts and H<sub>2</sub>S producing bacteria at the inner and middle cultivation locations, respectively. A significantly higher concentration of total psychrotrophic counts in October and presumptive *Aeromonas* in March. The diversity of species was reduced after depuration and varied as a function of location and season with the number of species and the occurrence of the species. Furthermore, the phylogenetics showed no clear groupings of *Escherichia sp.* and *E. coli* isolates. When testing for antibiotic resistance, it was observed that 24% of the *E. coli* isolates were ESBL-producing.

# Innhold

1	Introduksjon .....	1
2	Teoretisk bakgrunn.....	2
2.1	Kommersiell blåskjellproduksjon.....	2
2.1.1	Dyrking av blåskjell.....	3
2.1.2	Dyrkingslokasjon og sesong.....	3
2.1.3	Høsting av blåskjell.....	4
2.1.4	Revanning.....	5
2.1.5	Prosessering .....	7
2.2	Mikrobielt samfunn i blåskjell .....	7
2.2.1	Mesofile og psykrotrofe bakterier .....	8
2.2.2	<i>Shewanella</i> .....	8
2.2.3	<i>Vibrio</i> .....	9
2.2.4	<i>Aeromonas</i> .....	10
2.2.5	<i>Escherichia coli</i> .....	11
2.3	Antibiotikaresistente bakterier i marine miljø .....	12
3	Materialer og metoder .....	15
3.1	Prøvemateriale og eksperimentelt design.....	15
3.2	Mikrobiologisk prøvetaking av blåskjell.....	15
3.2.1	Påvisning av <i>Escherichia coli</i> .....	16
3.2.2	Statistisk analyse .....	17
3.3	Rendyrking og nedfrysing bakterier .....	18
3.4	Identifisering ved 16S rRNA sekvensering .....	18
3.4.1	Dyrking av kolonier.....	18
3.4.2	Isolering og kvantifisering av DNA.....	19
3.4.3	Polymerase Chain Reaction.....	19
3.4.4	Gel elektroforese.....	20
3.4.5	Rensing, kvantifisering og fortynning av PCR produkt .....	20
3.4.6	Fylogenetisk analyse .....	20
3.5	Testing for antibiotikaresistens i <i>E. coli</i> -isolater .....	21
4	Resultat .....	24
4.1	Effekt av revanning, dyrkingslokasjon og sesong på sammensetning av mikrobielt samfunn i blåskjell .....	24
4.2	Identifisering av mikrobielt samfunn i blåskjell ved bruk av dyrkingbasert metode.....	29
4.3	Fylogenetisk analyse basert på <i>Escherichia</i> arter .....	33
4.4	Antibiotikaresistens hos <i>Escherichia coli</i> .....	35
5	Diskusjon .....	37
5.1	Effekt av revanning på det mikrobielle samfunnet i blåskjell.....	37

5.2	Mikrobielt samfunn som effekt av dyrkingslokasjon og sesong.....	40
5.3	Fenotypisk karakterisering av sekvenser .....	43
5.4	Forekomst av antibiotikaresistens i <i>Escherichia coli</i> .....	45
6	Konklusjon .....	48
7	Veien videre .....	49



## Forord

Denne masteroppgaven er skrevet i forbindelse med masterprogrammet Matvitenskap, teknologi og bærekraft ved Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet (NTNU). Forsøket i oppgaven er gjennomført på Campus Kalvskinnet i perioden september 2022 til mars 2023.

Jeg ønsker gjerne å takke veilederne mine Sunniva Hoel og Anita Nordeng Jakobsen for god veiledning underveis i forsøket og ved rettleiding av masteroppgaven. Ønsker også å takke blåskjellprodusenten som har levert blåskjell og delt kunnskap. Videre ønsker jeg å takke medstudenter, venner og familie for god støtte gjennom mastergraden.

Marte Ramstad Holm

Trondheim, 15. mai 2023

# 1 Introduksjon

Etter flere år hvor blåskjellnæringen har prøvd og feilet, har dyrkingen av blåskjell etablert seg mer i Norge og salget for 2020 endte på 2033 tonn blåskjell (Duinker, Storesund & Lunestad, 2022). Å drive havbruk av arter lavere i næringskjeden i Norge er et politisk ønske og i andre Europeiske land dyrkes og spises det mer blåskjell (Havforskningsinstituttet, 2016). Grunnet næringsrik føde i havet, god plass og gode vann- og lokaliseringsforhold blir Norge produksjonsmessig ansett å ha et stort potensial for blåskjelloppdrett. Blåskjelloppdrett er en bærekraftig produksjon fordi skjellene ernærer seg på alger som filtreres gjennom gjellene (Havforskningsinstituttet, 2021). Blåskjellet filtrerer mellom 12 og 240 liter sjøvann per dag (Lunestad, Frantzen, Svanevik, Roiha & Duinker, 2016), og kontaminanter som virus, algetoksiner og patogene bakterier kan akkumuleres i skjellene (Lees, 2000).

De siste tiårene har forbruket av muslinger økt, samtidig som sykdomsutbrudd knyttet til disse har økt. Dyrkingslokalisasjoner er sårbare for påvirkning av vannmiljøet gjennom kloakkforurensning og tilsig fra land (Kijewska et al., 2023). Dersom hele blåskjellet med innvoller blir konsumert, enten rått eller ved lett varmebehandling er bioakkumulering av patogene bakterier en fare (Lees, 2000). Filterfôringen gjør at blåskjell kan gjenspeile kvaliteten på det marine miljøet rundt dem. Miljøforurensning av antimikrobielle midler kan også bli overvåket ved prøvetaking av blåskjell (Baralla, Demontis, Dessì & Varoni, 2021).

Hovedmålet med forskningen gjort i denne masteroppgaven var å kvantifisere og karakterisere det mikrobielle samfunnet i blåskjell som funksjon av revanning, dyrkingslokasjon og sesong ved hjelp av kulturbasert metodikk. Videre ble forekomst av antibiotikaresistens i *Escherichia coli* undersøkt som en indikator på antibiotikaresistens i det marine miljøet.

## 2 Teoretisk bakgrunn

### 2.1 Kommersiell blåskjellproduksjon

Blåskjell (*Mytilus edulis*) er et bløtdyr som er utbredt langs hele Norskekysten hvor den både vokser vilt i tidevannsonen og ved oppdrett. Bløtdyret er en del av familien Mytilidae og kan bli opptil 10 cm lange. Årlig dyrkes det rundt 1,5 – 2 millioner tonn med blåskjell i verden, hvor en tredjedel av dette skjer i Europa (Havforskningsinstituttet, 2021). Produksjon av blåskjell kan betraktes som en av de mest miljø og ressursvennlige måtene å produsere næringsmiddel på, både grunnet at de ernærer seg gjennom filterfôring, men også fordi det er arealeffektivt (Norgeskjell, u.å-c). Ved produksjon av blåskjell skal miljøregelverket følges slik at miljøet rundt oppdrett ikke blir forurenset eller skadet (Regjeringen, u.å). Ved kommersiell blåskjellproduksjon er det lite forurensning og det er relativt små naturinngrep (Havforskningsinstituttet, 2016). I løpet av et år kan et skjellanlegg produsere fra 500 kg til 2000 kg med mat per dekar, noe som gjør at oppdrett av blåskjell er en gunstig og en effektiv måte å produsere mat på med tanke på arealet som benyttes. Ved blåskjelloppdrett produseres opptil 50 ganger mer kjøtt enn storfe per arealenhet (Norgeskjell, u.å-c). Ved oppdrett av laks blir det produsert 15 000 kg per dekar (Regjeringen, 2015b) og er dermed mer arealeffektivt enn blåskjell. Produksjonstiden for blåskjell er tre år fra produksjon av yngel til distribusjon (Figur 1) (Norgeskjell, u.å-a).



Figur 1: Flytskjema over produksjon av blåskjell fra skjellyngel til distribusjon.

Prosesen ved blåskjelloppdrett begynner med produksjon av skjellyngel, videre dyrking av blåskjell i sjøen før de blir høstet og revannet. De gjennomgår også en prosessering med vasking og rensning før de blir sortert og pakket for distribusjon (Norgeskjell, u.å-b).

### 2.1.1 Dyrking av blåskjell

Blåskjell blir hovedsakelig dyrket på flytende anlegg langs kysten i motsetning til andre land som Danmark og Nederland som dyrker skjell på bunnen av sjøen fordi de har gode strømforhold, næringsrikt vann og godt klima (Bøhle, 1979). I Norge blir de dyrket i hengekulturer (Figur 2), som vil si at de henger i klynger på vertikale tau som går ned til 5 meters dyp (Norgeskjell, u.å-a).



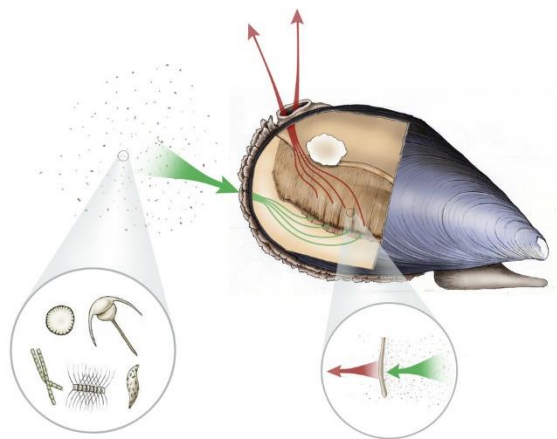
*Figur 2: Bilder av hvordan dyrkingsanlegg og hengekulturer ser ut, hvor venstre bilde viser oversiden av dyrkingsanlegget, mens bildet til høyre viser hvordan de henger i bærelinene (Norgeskjell, u.å-a).*

Produksjon av blåskjell begynner med samling av yngel ved bruk av yngelsamlere for å samle blåskjell fra gytingen (Norgeskjell, u.å-c). Det henges tau eller bånd under anleggene hvor blåskjellene dyrkes for å samle opp. Ved bruk av blåskjellstrømper kan yngelen legges i disse for å vokse eller så henger de bare på yngelsamleren (Bøhle, 1979). Skjellyngelen ligger i sjøvannet i et år, før den blir høstet og yngelen blir sortert. Dyrkingen fortsetter i to år til etter de har blitt satt ut før blåskjellene blir høstet. Et blåskjellanlegg består som regel av 5-20 bæreliner og kan dekke fra 10 til 200 dekar (Norgeskjell, u.å-a).

### 2.1.2 Dyrkingslokasjon og sesong

Dyrkingslokasjonen til blåskjellene og sesong spiller en viktig rolle med tanke på vekst, kvalitet og mattrygghet. Blåskjell kan leve under ugunstige forhold, noe som gjør de til resistente organismer (Baralla et al., 2021). Allikevel kan de lokale forholdene i sjøen gi en fordel ved dyrkingen av dem, som at det kan være hensiktsmessig med en viss andel ferskvann med saltvannet. For at næringsopptaket til blåskjellene skal bli høyest mulig bør temperaturen i sommerhalvåret være relativt høy. Fysiske faktorer som urolig sjø, mye vind og islegging bør unngås, da dette kan gi skade på dyrkingsanlegget og blåskjellene (Bøhle, 1979).

Store nedbørs mengder kan føre til avrenning av avføring fra landbruket og gi overbelastning for kloakkanlegget slik at fekale organismer og antimikrobielle midler havner i havet (Lunestad et al., 2016). Klimaendringer påvirker temperaturen i luften og vannet, og kan påvirke mengden nedbør, noe som påvirker spredningen av patogene bakterier i vann- og næringsmidler (Kijewska et al., 2023). Blåskjell blir ofte dyrket hvor det er stor næringstilgang og hvor vannet er skjermet. Dette medfører også en større sjanse for at skjell blir eksponert for smittestoff fra menneskelig kloakk som de kan filtrere, konsentrere og beholde (Lees, 2000). Partikler som er i omgivelsene til blåskjell blir filtrert mellom de to skjellene og gjennom gjellene og til slutt videre til fordøyelseskanalen (Figur 3) (Grevskott, 2020).



*Figur 3: Illustrasjon over blåskjellens filterføringssystem. Blåskjellet filtrerer inn vann og partikler ved grønn pil, går gjennom gjellene, så slippes ut ved de røde pilene (Andrews, 2013).*

Hvilke partikler som blir selektert og filtrert avhenger blant annet av konsentrasjonen av partiklene i havet. Ved god tilgang av partikler selekterer blåskjellene ut de levende organismene og partiklene, men dersom det er lite tilgang på partikler blir seleksjonsresponsen redusert og de filtrerer det meste som er tilgjengelig (Rosa, Ward & Shumway, 2018). Temperatur påvirker filterhastigheten hvor temperaturer på 10-26°C medfører en konstant filtrering, men ved under 5°C vil den reduseres (Gosling, 2003).

### 2.1.3 Høsting av blåskjell

Ved høsting blir blåskjell tatt opp av høstefartøy og skjell som er store nok blir transportert til fabrikk, mens for små blåskjell blir satt ut i sjøen igjen for å vokse videre (Norgeskjell, u.å-a). Produsenten av blåskjell har ansvar for at blåskjell som blir høstet er trygge å spise, og de

skal ikke overskride grenseverdier for patogene bakterier og toksiner gitt i forordning 853/2004 (2011), og grenseverdier for tungmetaller og miljøgifter gitt i forordning 1881/2006 (2014) (Mattilsynet, 2019b).

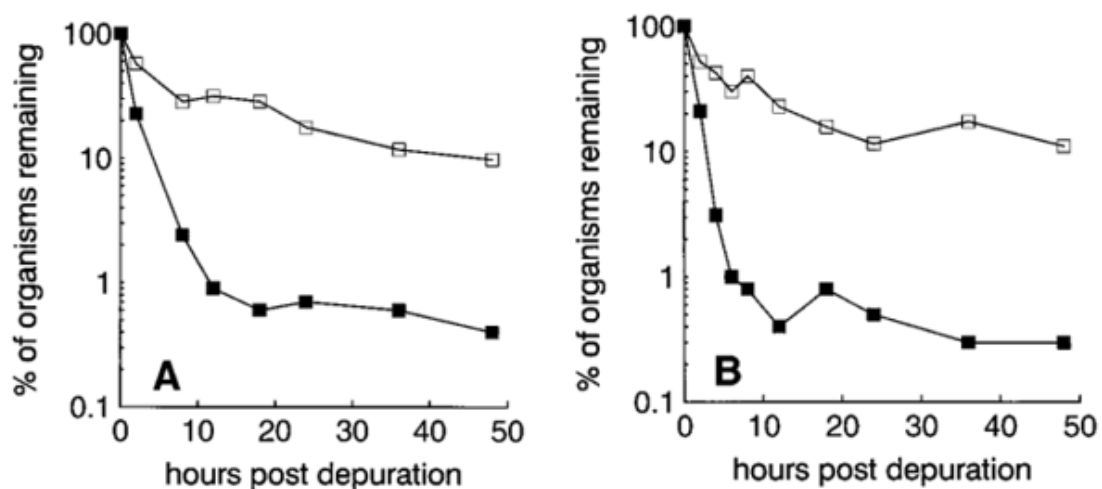
I henhold til EU forordning 854/2004 (2011) klassifiserer Mattilsynet dyrkingslokasjonene for blåskjell som enten A-, B- eller C-områder etter forekomsten av *E. coli*. Et dyrkingsområde kan klassifiseres som A-område dersom konsentrasjonen av *E. coli* ikke overskrider 230 *E. coli* per 100 g prøvemateriale i 80 % av prøvene. Dersom det påvises høyere konsentrasjon av *E. coli* enn dette og mindre enn 4600 *E. coli* per 100 g klassifiseres det som et B-område. Et C-område blir klassifisert ved konsentrasjoner mellom 4600 og 46 000 *E. coli* per 100 g prøvemateriale. Disse blåskjellene må bli lagt ut i et A-klassifisert område for fjerning av *E. coli* over en lengre tidsperiode. Blåskjell fra et A-område kan gå rett til konsum, mens fra et B-område må blåskjellene enten legges ned i et A-område eller renses ved revanning (Mattilsynet, 2019a). For påvisning og kvantifisering av *E. coli* i blåskjell blir Most probable number (MPN)-metoden benyttet ved testing av innmat og kappevann (Grevskott, Svanevik, Wester & Lunestad, 2016).

#### 2.1.4 Revanning

Etter høsting må blåskjellene gjennom en revanningsprosess hvor hensikten er å fjerne fekale kontaminanter i gjellene og fordøyelsessystemet (FAO, 2010). Revanningen blir utført ved å legge de levende blåskjellene i en tank med kontinuerlig gjennomstrømning av rent sjøvann (Rees & World Health, 2010). Som et eksempel fra en norsk blåskjellprodusent blir sjøvann til revanning hentet fra omtrent 56 meters dybde, og sjøvannet behandles i tillegg med UV-lys. Dette kan ta alt fra flere timer til dager, noe som bestemmes av krav fra lovgivning eller hvilke krav som stilles til produsenten av kunder (FAO, 2010). Revanning brukes som et trinn for å sikre at det er lavest mulig konsentrasjon av fekale mikroorganismer i blåskjellene, som *E. coli*, og metoden har vist effektiv fjerning av disse kontaminantene (FAO, 2010). Ved fjerning av virale kontaminanter som Norovirus og Hepatitt A har revanning vist å være mindre effektiv, som også gjelder for marine vibrioer (*V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus*), tungmetaller og organiske kjemikalier. Dette gjelder også biotoksiner som PSP (Paralytic Shellfish Poisoning), og DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoning) (FAO, 2010), som kan finnes langs norskekysten. Toksinene gir verken smak eller lukt til blåskjellene, fjernes ikke ved varmebehandling og det

er derfor viktig å vite hvor oppblomstring av algetoksiner forekommer (Folkehelseinstituttet, 2019b).

Prinsippet med revanning er at blåskjellene skal gjenoppta sin vanlige filtreringsaktivitet slik de filtrerer inn det rene sjøvannet mens kontaminantene blir skylt ut. Hvordan blåskjellene blir håndtert er essensielt fordi de er følsomme for stress og konsekvensen av feil håndtering kan være at de ikke gjenoppretter filterføring. De fysiologiske omgivelsene som konsentrasjon av oppløst oksygen, forhold mellom skalldyr og vann, vannføring, saltholdighet, temperatur og turbiditet må være oppfylt dersom skjellene skal gjenoppta filtreringen (Rees & World Health, 2010). Tiden det tar for å fjerne kontaminasjon av bakterier varierer, men etter 48 timer er mesteparten fjernet (Martínez, Rodríguez-Calleja, Santos, Otero & García-López, 2009). Det er vist at det tar 6,5 timer å redusere nivået av *E. coli* med 90 % i de fleste tilfellene, og etter 12 timer med revanning ble det oppnådd en fjerning på over 99 % (Dore & Lees, 1995). Dore og Lees (1995) gjennomførte et forsøk der de testet om eksponeringstiden av kloakk spilte noe rolle på reduksjon av *E. coli*, og konkluderte med at det ikke hadde noe virkning (Figur 4).



Figur 4: Oppnådd reduksjon av *E. coli* (sorte symboler) og *F+* bakteriofag (åpne symboler) i blåskjell som funksjon av revanningstid (timer) ved A) eksponering for kloakk over en kortere tid (1 til 3 uker) og B) eksponering for kloakk over en lengre periode (6 måneder) (Dore & Lees, 1995).

Ved utskillelse av innhold fra blåskjellenes tarmsystem er det viktig at revanningstanken er designet slik at kontaminantene kan separeres og fjernes fra tanken (Rees & World Health, 2010). For å ha kontroll på revanningsprosessen går batchene av blåskjell inn og ut sammen og tanken vaskes mellom hver batch (FAO, 2010).

En kombinasjon av å høste blåskjell fra rene områder (klasse A), og tilstrekkelig revanning vil gi en lavere risiko for sykdom forårsaket av fekalt kontaminerte blåskjell (FAO, 2010). Detaljer om hvordan revanning skal foretas blir ikke nevnt i EU-regelverket, men kravet er at «Driften av rensesystemet må tillate at levende muslinger raskt kan gjenoppta og opprettholde filterfôringsaktivitet, eliminere kloakkforurensning, ikke bli forurenset på nytt og for å kunne forbli i live i egnet tilstand etter rensing for innpakking, lagring og transport før de bringes til omsetning» (FAO, 2010).

#### 2.1.5 Prosessering

Etter revanningen blir skjellene lagt på pakkelinjen for prosessering hvor de blir vasket og børstet rene. Videre blir de transportert til en maskin som napper ut festetrådene fra skjellene. Blåskjellene blir pakket i enten plastnett eller i tette plastesker, så videre satt på kjølelager før distribusjon. Et ferskt produkt sikres ved å bruke få timer fra revanningen til distribusjon (Norgeskjell, u.å-b).

Ved produksjon av blåskjell er det viktig å ha en internkontroll som samler rutinene som er laget for å etterleve regelverket. Det er dermed viktig med grunnforutsetninger som god produksjonshygiene, renhold, personalhygiene og kontroll på kjøletemperaturer. Det er følgelig viktig med tilstrekkelig opplæring for å oppfylle dette (Mattilsynet, u.å). Ved prosessering av blåskjell er det viktig å opprettholde kjølekjeden, fordi det gjør at blåskjellene overlever fra høsting og til distribusjon. Temperaturer rundt 1-2°C er optimalt (Rønneberg, 2007).

## 2.2 Mikrobielt samfunn i blåskjell

Det mikrobielle samfunnet i blåskjell kan gjenspeile det mikrobielle samfunnet i det marine miljøet, da blåskjell filtrerer og oppkonsentrerer bakterier, virus og andre partikler som er i omgivelsene. For påvisning av fekal kontaminasjon er blåskjell en god indikator, hvor bakterier som *E. coli* og andre i familien *Enterobacteriaceae* kan forekomme (Grevskott, Svanevik, Sunde, Wester & Lunestad, 2017). I tempererte havområder i hele verden vokser det blåskjell og på grunnlag av skjellenes biologiske og økologiske egenskaper, kan de brukes til å vurdere miljøkvaliteten til sjøvann (Beyer et al., 2017). Ved økt bruk av havet til transport, menneskelig



aktivitet og dumping av avfall har bevisstheten om at sykdommer kan oppstå økt. Kontaminerte blåskjell på markedet er en trussel for mattryggheten, da disse kan inneholde patogene bakterier og virus som kan føre til sykdom ved konsum (Munn, 2005). Mikrobiotaen i blåskjellet kan variere ved forskjellige lokasjoner, da den endres ved blant annet klimaendringer, saltinnhold og forurensning (Kijewska et al., 2023). Den påfølgende beskrivelsen av mikrobielt samfunn i blåskjell er begrenset til å gjelde bakterier, mens virus ikke omtales nærmere.

### 2.2.1 Mesofile og psykrotrofe bakterier

Bakterier kan deles inn i ulike grupper basert på deres optimumstemperatur for vekst, slik som mesofile og psykrotrofe bakterier (Jay, Loessner & Golden, 2021). Humanpatogene bakterier er i all hovedsak mesofile og har optimumstemperatur ved 35-40°C (Granum, 2015). Eksempler på mesofile patogene bakterier er *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp.* og noen stammer av *E. coli* (Schiraldi & Rosa, 2014). Psykrotrofe bakterier trives ved lavere temperaturer rundt 0-20°C og de slektene som forekommer mest i næringsmidler er *Pseudomonas* og *Enterococcus* (Jay et al., 2021), men også *Shewanella*, *Vibrio*, *Photobacterium* og *Aeromonas* (Huss, 1995).

### 2.2.2 *Shewanella*

*Shewanella* er en mesofil bakterie som tilhører familien *Shewanellaceae* (Yu, Huang, Xiao & Wang, 2022) og 70 arter er beskrevet (Yu et al., 2022). Optimumstemperaturen til *Shewanella* er på over 16°C, men har evne til å vokse ved under 5°C siden de er psykrotolerante (Hau & Gralnick, 2007). En slik evne gjør at bakteriene kan vokse i kalde miljøer og i miljøer hvor temperaturendringene er store ved ulike årstider (Hau & Gralnick, 2007). *Shewanella* overlever i forskjellige økologiske nisjer, siden den har en fysiologisk allsidighet (Yu et al., 2022). Slekten er mangfoldig og den kan finnes i marine og ferskvannsmiljøer, og blir dermed ofte isolert fra marine miljøer (Hau & Gralnick, 2007).

Dette er en typisk hydrogensulfid (H<sub>2</sub>S) produserende bakterie, sammen med *Vibrio* og slekter av familien *Enterobacteriaceae* (Doyle, Buchanan & American Society for, 2013), som *Escherichia*, *Klebsiella* og *Proteus* (Murros, 2022). Flere arter av *Shewanella* kan forårsake

forringelse av mat, slik som *Shewanella baltica* som er en vanlig bakterie både i havet og i fisk (Nagelsen & Fagerbakke, 2023).

*Shewanella* blir knyttet opp til sykdom grunnet sin utbredelse, en rask generasjonstid og dens verdensomspennende utbredelse (Hau & Gralnick, 2007). I varmere perioder i Norge har blant annet *Shewanella putrefaciens* vært årsaken til sårinfeksjoner ved bading (Naseer et al., 2019). Sykdom av *Shewanella* gir samme sykdomsbilde som ved *Vibrio*-infeksjoner og mennesker med underliggende sykdommer kan få et mer alvorlig sykdomsforløp (Folkehelseinstituttet, 2019c).

### 2.2.3 *Vibrio*

Slekten *Vibrio* tilhører familien *Vibrionaceae* og består av hittil over 100 beskrevne arter hvorav 12 arter er beskrevet som patogene (Baker-Austin et al., 2018). Spesielt *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* og *Vibrio parahaemolyticus* er patogene *Vibrio*-arter som finnes i tropiske farvann og spesielt i sommermånedene, da vannet er varmere (Reilly & Kaferstein, 1997). De er gram-negative, stavformede, trives ved temperaturer over 17°C og har en toleranse for et bredt spekter av saltholdighet (Baker-Austin et al., 2018; Belkin & Colwell, 2005). Bakterien forekommer naturlig i ferskvann, elvemunninger og marine miljø, men foretrekker brakkvann grunnet lave saltkonsentrasjoner (Baker-Austin et al., 2018). Infeksjoner av *Vibrio* kan komme av kontaminert sjømat som enten blir konsumert rå eller underkøkt (Baker-Austin et al., 2018).

Det er en økt bekymring for klimaendringer og økt temperatur i forbindelse med spredning av bakterielle vannbårne infeksjonssykdommer, som *Vibrio*-sykdom (Baker-Austin et al., 2013). Global oppvarming og økt temperatur i havoverflaten anses til å være assosiert med økningen av *Vibrio* sykdommer over hele verden, da temperatur fremmer vekst og utholdenhet til *Vibrio* arter (Vezzulli, Colwell & Pruzzo, 2013).

Arten *V. cholerae* har forekomst i brakkvann i tropiske miljøer og ved en kombinasjon med planktonblomsting, gunstig temperatur- og næringsforhold vil antallet være høyt (Granum, 2015). Den patogene arten *V. vulnificus* har også blitt påvist i Norden og i Norge er den påvist i et lite antall blåskjell (Granum, 2015). Ved kyst- og brakkvannsområder med vanntemperaturer på 30°C kan *V. parahaemolyticus* forkomme. Bakterien er også påvist i Alaska og sørlige Chile, som ikke er typiske varme havområder (Granum, 2015).

Infeksjonene forårsaket *Vibrio* reflekterer sesongen, hvor varmeste månedene har flest tilfeller (Baker-Austin et al., 2018). Sykdommer av patogene bakterier av denne slekten deles inn i kolera og ikke-kolera infeksjoner. *V. cholerae* gir kolera infeksjon, som kan føre til alvorlig diarèsykdom, som har ført til epidemisk og pandemisk utbrudd (Baker-Austin et al., 2018; Belkin & Colwell, 2005). Både *V. parahaemolyticus* og *V. vulnificus* gir ikke-kolera infeksjoner, men forårsaker vibriose (Baker-Austin et al., 2018). Konsum av kontaminert sjømat av bakterien kan det føre til bakteriell gastroenteritt (Joseph, Colwell & Kaper, 1982).

#### 2.2.4 *Aeromonas*

*Aeromonas* er en slekt under familien *Aeromonadaceae* og det er i dag beskrevet 36 arter av slekten (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). Slekten *Aeromonas* er gram-negative, fakultativt anaerobe og de fleste mesofile har et vekstoptimum mellom 35-37°C, mens de fleste artene vokser mellom 4°C og 42°C (Percival & Williams, 2014). Til tross for vekst ved alle atmosfærer, er dette sjeldent årsaken til matforgiftning (Granum, 2015).

*Aeromonas* har blitt isolert fra en rekke matvarer som fisk, kjøtt, blåskjell, melk og grønnsaker, men påvist i større grad blant sjømat (Stratev & Odeyemi, 2015). Miljøer hvor bakterielle økosystemer eksisterer kan slekten isoleres, da den blir sett på som en bakterie som kan overleve overalt i miljøet (Janda & Abbott, 2010). Slekten blir i stor grad forbundet med vann og akvatiske miljøer, og den har også blitt isolert fra blant annet sjøvann, drikkevann, grunnvann, kloakk, elver og innsjøer (Janda & Abbott, 2010). Blåskjell filtrerer vann i omgivelsene og kan dermed være utsatt for å filtrere inn og oppkonsentrere *Aeromonas*, da denne slekten kan finnes i elvemunningsvann (Janda & Abbott, 2010). Spesielt arten *Aeromonas hydrophila* forbindes med marine akvakulturer og finnes mange steder hvor det er fersk- og brakkvann (Granum, 2015). Siden *A. hydrophila* lever i akvatiske miljø blir den utsatt for miljøstress som temperaturendringer, sur pH og lite næringstilgang, som kan føre til bedre overlevelse, noe som er til bekymring (Awan et al., 2018). I flere deler av verden har økningen av *A. hydrophila* sin resistens mot antibiotika, spesielt penicillin og ampicillin blitt meldt som et problem (Stratev & Odeyemi, 2015).

Blant artene er det *A. hydrophila*, *A. caviae* og *A. veronii* biotype *sobria* som dominerer antallet infeksjoner hos mennesker (Ottaviani et al., 2006). *Aeromonas salmonicida* har også skapt

infeksjon hos mennesker, knyttet til fiskesykdommer og er dominerende art i fisk og vannprøver (Fernández-Bravo & Figueras, 2020; Janda & Abbott, 2010). Konsum av patogene *Aeromonas* kan føre til en rekke sykdommer hos mennesker, for det meste gastroenteritt, sårinfeksjoner, blodforgiftning og immunkompetent (Fernández-Bravo & Figueras, 2020). Inkubasjonstiden på sykdom varierer alt ettersom hvilke arter eller toksiner som forekommer, og varierer fra mellom seks til 48 timer (Granum, 2015).

#### 2.2.5 *Escherichia coli*

*E. coli* tilhører familien *Enterobacteriaceae*, hvor også patogene bakterier som *Klebsiella*, *Yersinia*, *Shigella spp.* og *Salmonella* går under samme familie (Granum, 2015). *E. coli* er en gram-negativ fakultativ anaerob stavbakterie og er en mangfoldig art (Jang et al., 2017). Bakterien vokser mellom 7-48°C og har et vekstoptimum på 37°C (Granum, 2015).

*E. coli* brukes som en indikatorbakterie for fekal forurensning og prøvetaking av blåskjell er en god indikator på kloakk kontaminasjon (Kijewska et al., 2023). Bakterien er utbredt i det marine miljøet og har også tilstedeværelse i mage-tarmkanalen til varmblodige mennesker og dyr (Campos, Kershaw & Lee, 2013). Til tross for bruk av *E. coli* som indikator for fekal forurensning er enteriske virus antatt vanligste årsak til sykdom ved konsum av muslinger. Dette skyldes at enteriske virus, slik som norovirus, kan overleve lengre enn indikatororganismen *E. coli* i marine miljø og i blåskjellenes fordøyelsessystem (Hernroth, Conden-Hansson, Rehnstam-Holm, Girones & Allard, 2002). Konsentrasjonen av *E. coli* i muslinger kan være mye større enn omgivelsene til dem (Richards, 1988).

Stammer som Shiga-produserende *E. coli* (STEC), enteropatogene *E. coli* (EPEC), enterotoksigen *E. coli* (ETEC), enteroaggregative *E. coli* (EAEC), diffust adherent *E. coli* og enteroinvasiv *E. coli* har evne til å forårsake gastrointestinale sykdommer som diarè (Jang et al., 2017). Stammene blir kategorisert etter fenotypiske trekk, kliniske symptomer, virulensfaktorer og epidemiologiske bevis (Sperandio & Hovde, 2015). EHEC har forårsaket mange utbrudd både i vann og mat, og denne stammen kan føre til alvorligere tarmsykdommer ved utskillelse av toksin, som kan føre til nyresvikt og død (Jang et al., 2017; Sperandio & Hovde, 2015).

Ved påvisning av *E. coli* i blåskjell benyttes en standardisert EU referansemetode basert på MPN-prinsippet. Prinsippet går ut på å lage tre fortyninger, fem ganger for hver prøve, hvor resultat av positive prøver blir overført til en MPN-verdi etter bekreftelse på kromogena gar (Grevskott et al., 2016).

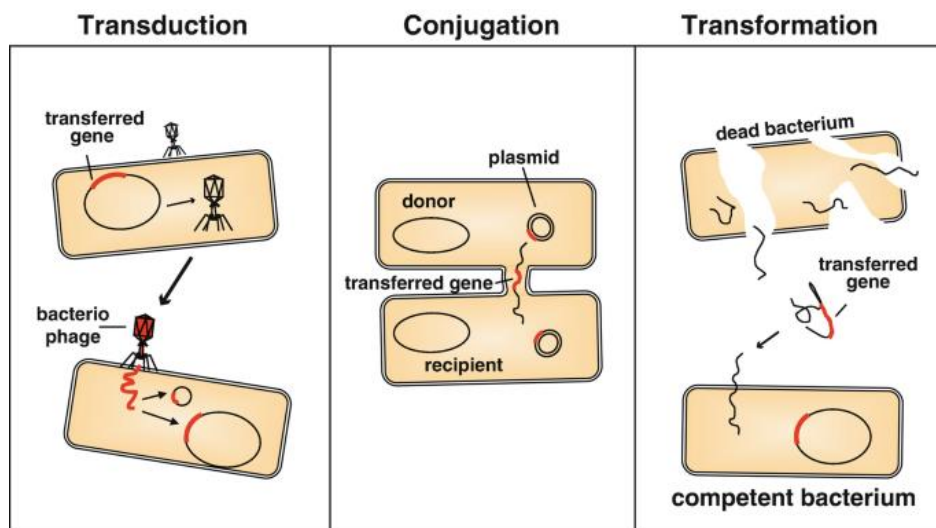
### 2.3 Antibiotikaresistente bakterier i marine miljø

En global helseutfordring som verden står ovenfor i dag, er antimikrobiellresistens (WHO, 2014). Antibiotikaresistente bakterier er bakterier som mangler evne eller har en redusert evne for at veksten hemmes ved bruk av et antimikrobielt middel. Konsekvensene av antibiotikaresistente bakterier er at det antimikrobielle midlet ikke vil fungere som først tenkt og kan bli helt ubrukelig (EFSA, 2022). Både i Norge og globalt er antibiotika resistens et problem som øker med tiden (Regjeringen, 2015a). I 2019 døde så mange som 1,2 millioner mennesker grunnet antibiotikaresistente bakterielle infeksjoner og 4,95 millioner dødsfall assosiert med dette. Dersom antibiotikaresistens fortsetter å spre seg kan det ta 10 millioner liv årlig innen 2050 (Ikuta et al., 2022). I Europa brukes antimikrobielle midler som medisin til human bruk og til matproduserende dyr, noe som kan resultere i videre utvikling av antibiotika resistente bakterier. Dersom de antimikrobielle midlene ikke brukes rett ved medisin kan det føre til videre resistensutvikling (EFSA, 2022). Sammenlignet med andre Europeiske land bruker Norge mindre antibiotika, fordi antibiotika ikke brukes som vekstfremmende middel ved produksjon av mat og har et lavere forbruk av antibiotika til dyr. Det er hensiktsmessig å redusere bruken av antibiotika hos mennesker i Norge (Regjeringen, 2015a). Hvor effektiv en type antibiotika er avhenger av konsentrasjonen antibiotika som trengs for å hemme veksten av bakterien. Ved behandling skal konsentrasjonen av antibiotika være høyere enn den minste inhibitoriske konsentrasjonen (MIC) (Grevskott, 2020).

Blåskjell ansett til å være en god bioindikator på forekomst av antibiotikaresistente bakterier i marine miljø, fordi de filtrerer og akkumulerer omgivelsene sine (Grevskott et al., 2017). Ved store nedbørsmengder kan antibiotika fra landbruket og i kloakken føres til havet og spre antimikrobielle substanser i det marine miljøet (Lunestad et al., 2016). Fekale bakterier med antimikrobiell resistens kan spres til mennesket via direkte kontakt med dyr eller mennesker, men også ved inntak av mat og vann (Grevskott et al., 2017). Kloakkanlegg er et samlepunkt for mikroorganismer og antimikrobielle stoffer fra avføring, helsevesen eller farmasøytisk

industri (Folkehelseinstituttet, 2020). Bakteriene i næringsmidlene kan være ansvarlige for spredning og overføring av antibiotikaresistente gen (Kijewska et al., 2023). At bakteriefloraen til mennesker eller dyr blir eksponert for antimikrobielle stoffer blir sett på som det viktigste stedet for utvikling av resistens (Folkehelseinstituttet, 2020). Når antimikrobielle resistente bakterier etablerer seg i en persons bakterieflora, vil denne personen være en frisk bærer av disse resistente bakteriene og kan bidra til sykdom (Folkehelseinstituttet, 2021). De resistente bakteriene ender opp i kloakken hvor de igjen kan introdusere deres antibiotikaresistente gen til det nye miljøet. Overvåking av antibiotikaresistente bakterier er essensielt for å hindre utvikling blant nye miljøer, hindre utbrudd som kan true konsumentene og de som håndterer næringsmidler (Kijewska et al., 2023). Betydningen for antibiotikaresistens i det marine miljøet er fortsatt usikkert, men at det trengs mer forskning over tid for å samle mer kunnskap om situasjonen (Folkehelseinstituttet, 2020).

Horizontal genoverføring er en mekanisme som kan utvikle og spre antibiotika resistens og andre adaptive egenskaper, hvor genetisk informasjon blir overført mellom mikroorganismer (Francino, 2012). Denne har tre genetiske mekanismer som er naturlig transformasjon, konjugasjon eller transduksjon (Figur 5) (Blokesch, 2015).



Figur 5: Horizontal genoverføring illustrert for de tre ulike mekanismene transduksjon, konjugasjon og transformasjon for overføring av gen (Blokesch, 2015).

Ved transduksjon overfører et bakteriofag genetisk materiale fra en infisert celle til en annen. Konjugasjon mekanismen overfører genetisk materiale når to celler er i nærhet av hverandre og ved transformasjon blir fritt DNA tatt opp i cellen fra omgivelsene (Blokesch, 2015). Horizontal overføring av plasmider er en sentral del av den raske økningen av antimikrobiell

resistens, fordi den inneholder resistensgener som er essensiell mekanisme for at antibiotika resistens kan spre seg. Plasmidet kan også sørge for at bakterien er resistent mot flere typer antibiotika, fordi plasmidet kan være bærer av det (Mathers, Peirano & Pitout, 2015). Dersom en organisme er resistent mot minst et antimikrobielt stoff i tre eller flere antimikrobielle klasser blir den definert som multiresistent (Magiorakos et al., 2012).

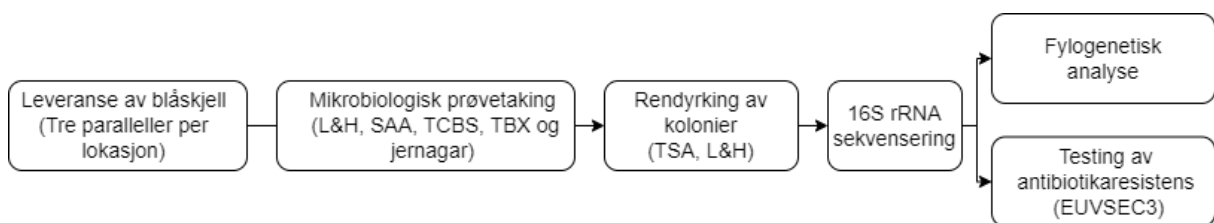
Resistente mekanismer som bakteriene bruker er å begrense opptaket av antibiotika, endre proteinet slik antibiotikaene ikke vet hvor målet er, antibiotikaene kan inaktiveres ved at bakterien lager ødeleggende proteiner og aktiv utstrømming ved å lage pumper. Mikroorganismer kan enten få disse mekanismene naturlig eller at de er ervervet fra andre mikroorganismer (Reygaert, 2018). Blant *Enterobacteriaceae* har det globalt de siste årene blitt raskere utvikling av antimikrobiell resistens mot fluorokinolon-, cefalosporin- og karbapenem (Mathers et al., 2015). WHO (2014) rapporterte høy forekomst av *E. coli* resistens mot tredje-generasjons cefalosporiner, inkludert resistens av utvidet spektrum beta-laktamaser (ESBL) og mot fluorokinoloner. Blant gram-negative bakterier blir beta-laktamaser sett på som den viktigste resistensmekanismen, noe som er en utfordring grunnet beta-laktamaser er de mest brukte antibiotikaene mot gram-positive og gram-negative bakterier (Sundsfjord, Simonsen, Haldvorsen, Lundblad & Samuelsen, 2008).

### 3 Materialer og metoder

#### 3.1 Prøvemateriale og eksperimentelt design

Forsøket ble utført fra oktober 2022 til april 2023. Blåskjellene ble levert fra en kommersiell produsent, og skjellene kom fra tre ulike dyrkingslokasjoner i en terskelfjord som heretter blir omtalt som indre dyrkingslokasjon, midtre dyrkingslokasjon og ytre dyrkingslokasjon. Forsøkene ble satt opp for å studere effekt av revanning, dyrkingslokasjon og sesong på det mikrobielle samfunnet i blåskjell, noe som resulterte i seks eksperimentelle grupper: Før (F) og etter (E) revanning ved indre (I), midtre (M) og ytre (Y) dyrkingslokasjon. En revanning på mist 24 timer ble utført på prosesseringsanlegget før tilsending. Prøveuttaket ble utført to ganger med blåskjell som ble høstet i oktober og mars.

Ved leveranse av blåskjellene ble tre paralleller fra hver dyrkingslokasjon brukt ved mikrobiologisk prøvetaking på de utvalgte vekstmediene. En kvantitativ plukking av kolonier fra vekstmediene og rendyrking av disse ble gjennomført for en videre identifisering ved 16S rRNA sekvensering. Basert på sekvensresultatene ble det gjennomført en fylogenetisk analyse og testing av antibiotikaresistens. Oversikten over hvilke trinn forsøket inneholdt (Figur 6), og en detaljert beskrivelse av forsøket forkommer i påfølgende kapitler.



*Figur 6: Flytskjema som viser den overordnede prosessen fra leveranse av blåskjell til mikrobiologisk prøvetaking av skjellene og rendyrking av kolonier med videre identifisering ved 16S rRNA sekvensering, fylogenetisk analyse og en antibiotikaresistens testing.*

#### 3.2 Mikrobiologisk prøvetaking av blåskjell

Ved mikrobiologisk analyse av blåskjellene ble det analysert tre paralleller av hver prøve. Blåskjellene ble åpnet med en steril kniv og 50 g råmateriale bestående av innmat og kappevæske ble benyttet. Prøvematerialet ble plassert i en stomacherpose og tilført 100 ml peptonvann (1 g/l pepton (Oxoid LP0037) og 8,5 g/l NaCl (VWR 27810.295)). Prøven ble homogenisert i en stomacher-maskin i 2,5 minutter og en 1:10 fortykning ble oppnådd ved



tilførsel av 350 ml peptonvann i homogenatet som ble blandet godt. Videre ble det satt opp en 10-fold fortynningsrekke til  $10^{-4}$  i 15 ml rør.

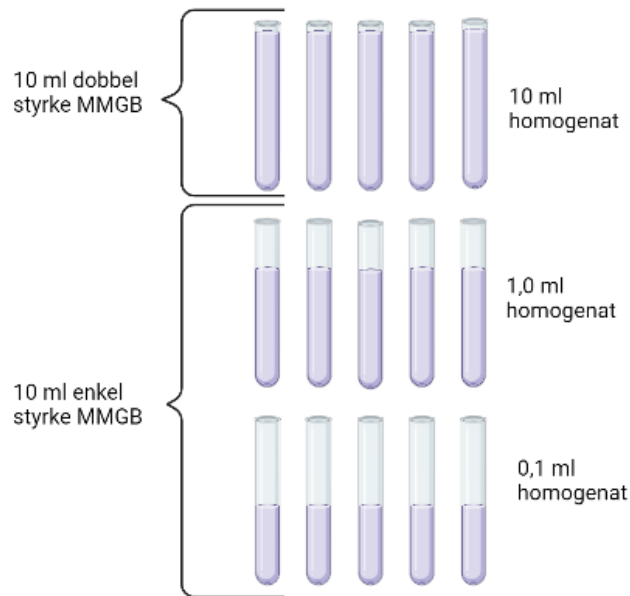
Det totale psykrotrofe kimtallet ble bestemt ved utplating på Long & Hammer agar som beskrevet i NMKL (Nordisk metodikomitee for næringsmidler) nr.184. Metoden ble også brukt for bestemmelse av mesofilt kimtall med bruk av Lyngby`s jernagar (Oxoid CM0964) med 0,04 % L-cystein. Ved bestemmelse av presumptive *Aeromonas* ble NMKL nr.150 brukt ved utplating på Stivelses-Ampicillin-Agar (SAA). NMKL nr.156 ble brukt for bestemmelse av presumptive *Vibrio* ved utplating på Thiosulfat-citrat-salt-sucrose-agar (TCBS) (Millipore 86348). Etter utplating ble skålene inkubert ved temperatur og tid som oppgitt i Tabell 1.

Tabell 1: Oversikt over temperatur og tid ved inkubasjon for Long & Hammer, jernagar, Stivelses-Ampicillin-Agar (SAA) og Thiosulfat-citrat-salt-sucrose-agar (TCBS).

AGAR	TEMPERATUR	TID
LONG & HAMMER	15°C	5 døgn – 7 døgn
JERNAGAR	22°C	72 timer ± 6 timer
SAA	37°C	24 og 48 timer
TCBS	37°C	24 og 48 timer

### 3.2.1 Påvisning av *Escherichia coli*

Ved påvisning av *E. coli* ble MPN-metoden benyttet og gjennomført som beskrevet i Grevskott et al. (2016). Det ble laget MMGB (Mineral modified Glutamate Broth) ved tilsetning av Mineral modified Glutamate Broth (Base) (Sigma-Aldrich 17171) og  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (VWR 21236-291). 10 ml av MMGB med dobbelt styrke ble tilført i fem kulturrør og 10 ml MMGB enkel styrke i 10 kulturrør. 10 ml av det 1:10 fortynnete homogenatet ble tilført hvert av rørene med dobbel styrke MMGB, mens henholdsvis 1.0 ml og 0.1 ml homogenat ble tilsatt fem rør med enkelt styrke MMGB (Figur 7).



Figur 7: Oppsett av enkel styrket og dobbel styrke MMGB rør og mengden av homogenat som skal tilføres i de ulike kulturrørene.

Ved fargeendring fra lilla til gul ved aerob inkubasjon på 37°C i 24 timer  $\pm$  2 timer ble prøvene antatt som positive. Positive prøverør ble sådd ut på TBX-agar (Tryptone Bile X-glucuronide Agar) (Sigma-Aldrich 92435) som ble delt inn i fem soner, hvor 10  $\mu$ l fra hver positiv prøve ble overført fra prøverørene og strøket ut på mediet. Prøvene ble inkubert ved 44°C i 22 timer  $\pm$  2 timer. Ved avlesning ble MPN-tabell «Most probable number of organisms: table for multiple tube method using 5 x 1 g, 5 x 0.1 g og 5 x 0.01 g» i FAO (2010) brukt.

### 3.2.2 Statistisk analyse

Statistisk analyse ble utført ved bruk av programvaren SPSS (Versjon 27, IBM Statistics). Den statistiske analysen ble utført på log-transformerte kimtall. Gjennomsnittsverdier er presentert med  $\pm$  ett standardavvik. Forskjeller i kimtall mellom grupper (før og etter revanning, mellom ulike dyrkingslokasjoner og mellom sesonger) ble testet ved bruk av enveis ANOVA og Tukey Post Hoc test med et signifikansnivå på 95 %.

Analysen ble gjennomført ved bruk av log transformerte verdier for hver av parallellene. I paralleller hvor det ikke ble påvist noe kimtall ble verdiene regnet som 1 og fikk en log transformert verdi på 0.

### 3.3 Rendyrking og nedfrysing bakterier

Etter avlesning ble det plukket kolonier fra skålene for å rendyrke dem. Kolonier ble plukket fra hvert medium og ved fortyntninger med tellbare kolonier. Det ble plukket kolonier fra forskjellige fortyntninger og antallet plukkede kolonier varierte fra skål til skål. Fra skålene med psykrotroft kimtall og mesofilt kimtall ble skålene delt inn i åtte sektorer hvor det ble plukket fire til seks kolonier fra en del.

Ved rendyrking av koloniene som ble plukket fra jernagar, TCBS, SAA og TBX ble TSA (Tryptone Soya Agar) (Oxoid CM0131) benyttet og kulturene ble inkubert ved 37°C i 24 timer. For rendyrking av kolonier plukket fra Long & Hammer agar ble koloniene rendyrket på det samme mediet og inkubert ved 15°C i 48 timer. Videre ble en koloni overført til en ny skål, hvor koloniene fra TSA ble overført til en ny skål med TSA. Koloniene fra Long & Hammer ble overført til TSA med ekstra tilsetning av NaCl (5 g/l). Temperaturen og tiden ved inkubasjonen for parameterne var de samme som ved første inkubasjon ved rendyrking.

For tillaging av ampuller til nedfrysing av isolatene ble hver renkultur tilsatt 2 ml frysemedium TSB (Tryptone Soya Broth) (Oxoid CM0129)) tilsatt 20 % glyserol (VWR 24388.195) rett på petriskålen. Løsningen ble blandet med koloniene samtidig som koloniene løsnet ved bruk av steril L-formet platespreder. 1 ml av bakteriesuspensjonen ble til slutt pipettert i et kryorør som ble fryst ved -80°C.

### 3.4 Identifisering ved 16S rRNA sekvensering

#### 3.4.1 Dyrking av kolonier

Ved oppdyrking av bakterieisolater til DNA-isolering ble de fryste ampullene på -80°C tatt opp i en kjølebeholder for å unngå fullstendig tining av ampullens innhold. Isolatene fra Long & Hammer ble dyrket på TSA med dobbel mengde NaCl og inkubert ved 15°C i 24 timer. De andre isolatene ble dyrket på TSA og inkubert ved 37°C i 24 timer.

Før DNA-isolering ble bakterieisolatene dyrket opp i 10 ml TSB, hvor kolonier fra TSA med dobbel mengde salt ble inkubert ved 15°C i 48 timer, mens resterende reagensrør ble inkubert ved 37°C i 24 timer. Cellene ble deretter høstet ved sentrifugering av 1 ml av denne kulturen.

### 3.4.2 Isolering og kvantifisering av DNA

For å isolere DNA ble det brukt to forskjellige kit, hvor DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) ble brukt på 45 isolat, mens GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fischer Scientific) ble brukt på 183 isolater. Protokollen for gram-negative bakterier ble brukt. Kvantifiseringen ble utført etter isoleringen, hvor DNA konsentrasjonen målt ved bruk av spektrofotometeret Powerwave XS av Biotek. Bølgelengdene som ble brukt ved kvantifiseringen var 230, 260 og 280 nm, og Elution Buffer (QIAGEN) ble brukt som blank.

### 3.4.3 Polymerase Chain Reaction

Polymerase Chain Reaction (PCR) ble gjennomført ved å lage en mastermix ved å følge protokollen PCR using HotStarTaq Master Mix i heftet HotStarTaq PCR Handbook (Tabell 2).

Tabell 2: Mastermix til PCR (Qiagen HotStarTaq PCR Handbook).

Komponent	µl/prøve	Sluttkonsentrasjon
HotStarTaq	0,125	2,5 U/per reaksjon
dNTP-mix	0,5	200 µM
10 x PCR buffer	2,5	1 x
338F primer	1	0.4 µM
1492R primer	1	0.4 µM
Nukleasefritt vann	17,875	-
Totalt	23	-

Det ble tilsatt 23 µl av mastermixen i PCR-rørene og 2 µl av DNA-templat. Det ble brukt en mengde DNA på 4-332 ng DNA/reaksjon. Et fragment på omtrent 1100 basepar av det bakterielle 16S rRNA genet ble amplifisert ved PCR ved bruk av primerene 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') (Muyzer, De Waal & Uitterlinden, 1993) og 1492R (5'-ACGGYTACCTTGTTACGACT-3') (Turner, Pryer, Miao & Palmer, 1999). Programmet som ble brukt til DNA amplifikasjonen framstilt i Tabell 3, ble utført med PCR-instrumentet C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad).

Tabell 3: Innstillinger for programmet for primerene 338F og 1492R ved PCR.

Temperatur (°C)	Tid	Trinn	Antall sykluser
95	15 min	Varmeaktivering	} 30
95	1 min	Denaturering	
58	30 sek	Hybridisering	
72	1 min	Polymerisering	
72	5 min	Avslutning	

#### 3.4.4 Gel elektroforese

For å sikre at PCR-produktet hadde rett størrelse ble det gjennomført en gel elektroforese av prøvene. Gelen ble laget ved tilsetning av 1,5 % agarosegel (Lonza) i 1 x TAE-buffer, som ble varmet opp og tilført 4 µl GelRed stain (QIAGEN). I et mikrosentrifugerør ble det blandet 5 µl av PCR-produktet og 1 µl Gelpilot Loading Dye 5x (QIAGEN), som videre ble tilført i brønnene i gelen. I hver endebrønn ble det tilført ladder 1 kp GeneRuler (Thermo Fischer Scientific). Gel elektroforesen ble utført ved 60V i 60 minutter og gelen ble tatt bilde av i en G-box (SynGene).

#### 3.4.5 Rensing, kvantifisering og fortynning av PCR produkt

Rensing av PCR-produkter før sekvensering ble gjort ved bruk av kittet GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fischer Scientific) og protokoll for DNA purification using centrifuge ble brukt. Produktet ble oppsamlet i en 2 ml mikrosentrifugerør og ble kvantifisert ved bruk av Elution Buffer som blank.

Før prøvene ble sendt til sekvensering ble de fortynnet med nukleasefritt vann for å oppnå en konsentrasjon på 10 ng/µl. Det ble overført 5 µl av fortynnet rensset PCR produkt, samt 5 µl av primer 338F med konsentrasjon 5 µM. Prøvene ble markert med barcodes før de ble sendt for Lightrun sekvensering til Eurofins Genomics (Tyskland).

#### 3.4.6 Fylogenetisk analyse

En fylogenetisk analyse av 16S rRNA gen-sekvensene fra bakterieisolater identifisert som *Escherichia sp.* og *E. coli* ble gjennomført ved bruk av programvaren MEGA 11. Fylogenetiske trær ble konstruert ved bruk av neighbour-joining metoden, og 1000 bootstrap-replikater ble benyttet for å teste treets struktur. Referansestammer for *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. albertii* og *E. marmotae* ble lastet ned fra RefSeq-databasen til NCBI (Tabell 4) og brukt for å undersøke

om de ukjente sekvensene grupperte seg med disse. Sekvensen til et bakterieisolat identifisert som *Enterococcus faecium* ble brukt som ut-gruppe i analysen (Tabell 4).

Tabell 4: Referansestammer som ble brukt ved fylogenetisk analyse. Hentet fra NCBI.

ID	Referansestamme
S1	NR_024570.1 Escherichia coli strain U 5/41 16S ribosomal RNA, partial sequence
S2	NR_112558.1 Escherichia coli strain JCM 1649 16S ribosomal RNA, partial sequence
S3	NR_027549.1 Escherichia fergusonii ATCC 35469 16S ribosomal RNA, partial sequence
S4	NR_025569.1 Escherichia albertii strain Albert 19982 16S ribosomal RNA, partial sequence
S5	NR_136472.1 Escherichia marmotae strain HT073016 16S ribosomal RNA, partial sequence
S6	MF-1_GEL455_Enterococcus faecium

### 3.5 Testing for antibiotikaresistens i *E. coli*-isolater

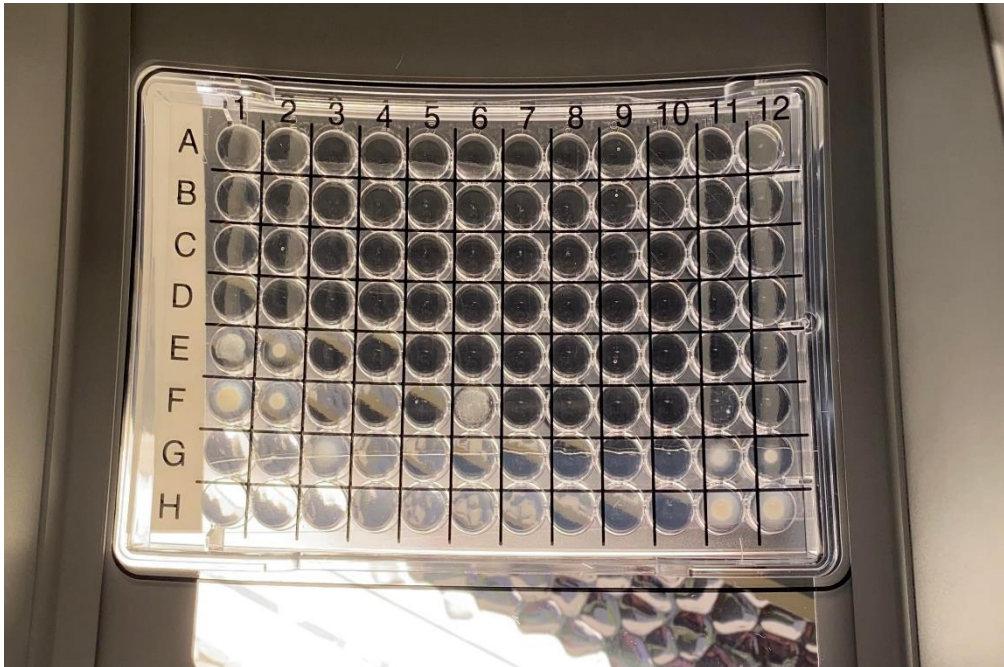
Ved antimikrobiell testing ble det valgt ut 34 *E. coli* isolater fra ulike agarer og dyrkingslokasjoner før og etter revanning. Isolatene og referansestammen CCUG 17620 (=ATCC25922) ble dyrket på TSA og inkubert ved 37°C i maks 24 timer.

Det ble laget rør med 11 ml Mueller Hinton Broth (Oxoid CM0405) tilsatt MgCl<sub>2</sub> (10 mg/ml Mg<sup>2+</sup>) x 6H<sub>2</sub>O og CaCl<sub>2</sub> (10 mg/ml Ca<sup>2+</sup>) x 2H<sub>2</sub>O, samt rør med 10 ml autoklavert ionefritt vann. Et turbidimeter (BioLog Model 21907) ble brukt for å måle transmittans av en Mac Farland standard, hvor transmittansen som ble avlest varierte fra 65-68 %. I rørene med ionefritt vann ble det overført kolonier fra TSA til transmittansen hadde samme verdier som Mac Farland standarden. 10 ml av ionefritt vann med kolonier ble pipettert over i rør med Muller Hinton Broth. Ved testing for antimikrobiell resistens ble de frysetørkede antibiotikaplatene EUVSEC3 (Thermo Fisher Scientific) benyttet. 50 µl av en prøve ble pipettert ut i hver brønn på en plate og inkubert aerobt ved 35°C i 18-24 timer. Oversikten over hvilke antibiotika det ble testet for og konsentrasjonen av de oppgis i Figur 8.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
A	AMP	AZI	AMI	GEN	TGC	TAZ	FOT	COL	NAL	TET	TMP	SMX	<b>ANTIMICROBICS</b> AMP Ampicillin MERO Meropenem CIP Ciprofloxacin AZI Azithromycin AMI Amikacin GEN Gentamicin TGC Tigecycline TAZ Ceftazidime FOT Cefotaxime CHL Chloramphenicol COL Colistin NAL Nalidixic Acid TET Tetracycline TMP Trimethoprim POS Positive Control SMX Sulfamethoxazole	
	32	64	128	16	8	8	4	16	64	32	16	512		
B	AMP	AZI	AMI	GEN	TGC	TAZ	FOT	COL	NAL	TET	TMP	SMX		
	16	32	64	8	4	4	2	8	32	16	8	256		
C	AMP	AZI	AMI	GEN	TGC	TAZ	FOT	COL	NAL	TET	TMP	SMX		
	8	16	32	4	2	2	1	4	16	8	4	128		
D	AMP	AZI	AMI	GEN	TGC	TAZ	FOT	COL	NAL	TET	TMP	SMX		
	4	8	16	2	1	1	0.5	2	8	4	2	64		
E	AMP	AZI	AMI	GEN	TGC	TAZ	FOT	COL	NAL	TET	TMP	SMX		
	2	4	8	1	0.5	0.5	0.25	1	4	2	1	32		
F	AMP	AZI	AMI	GEN	TGC	TAZ	CHL	CHL	CHL	CHL	TMP	SMX		
	1	2	4	0.5	0.25	0.25	8	16	32	64	0.5	16		
G	MERO	MERO	MERO	MERO	MERO	MERO	MERO	MERO	MERO	MERO	TMP	SMX		
	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	0.25	8		
H	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	POS	POS		
	0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8				

Figur 8: Oversikt over hvor de 15 antibiotikaene er plassert på EUVSEC3 platene og konsentrasjonen av dem. H11 og H12 er positiv kontroll.

Ved avlesning av brønnplaten ble hvitt bunnfall karakterisert som vekst, mens blanke brønner tilsvarer ingen vekst. Brønnene ble lest av i en Manual Viewbox (Thermo Fisher Scientific) (Figur 9).



*Figur 9: Plater med frysetørket antibiotika i brønnene fra EUVSEC3 med tilført prøve, hvor hvitt bunnfall regnes som vekst.*

De 15 antibiotikaene deles inn i hovedklassene betalaktam-antibiotika, aminoglykosider, tetrasykliner, makrolider og en diverse gruppe. Ceftazidime, cefotaxime, ampicillin og meropenem går under gruppen betalaktam-antibiotika, mens de som går under gruppen aminoglykosider er gentamicin og amikacin. Tetracycline og tigecycline går under hovedgruppen tetrasykliner, mens azithromycin går under hovedgruppen makrolider. De andre antibiotikaene som fluoroquinolones (nalidixic acid og ciprofloxacin), colistin, chloramphenicol, trimethoprim og sulfamethoxazole går under den diverse gruppen. Grenseverdiene som avgjør hvilke bakterieisolat som er sensitive eller resistente mot en antibiotika ble hentet fra EUCAST (2023) og CLSI (2020) (Tabell 5).

Tabell 5: Den minste inhiberende konsentrasjon (MIC) breakpoints for de ulike penicillinene som det ble testet for, hvor verdiene er gitt for sensitiv (S) og resistens (R).

Antibiotika	MIC breakpoints (mg/L)	
	S ≤	R >
AMP (Ampicillin)	8	8
MERO (Meropenem)	2	8
CIP (Ciprofloxacin)	0.25	0.5
AZI (Azithromycin)	-	16
AMI (Amikacin)	8	8
GEN (Gentamicin)	2	2
TGC (Tigecycline)	0.25	0.25
TAZ (Ceftazidime)	1	4
FOT (Cefotaxime)	1	2
CHL (Chloramphenicol)	-	16
COL (Colistin)	2	2
NAL (Nalidixic Acid)	16	32
TET (Tetracycline)	-	4
TMP (Trimethoprim)	4	4
SMX (Sulfamethoxazole)	256	512

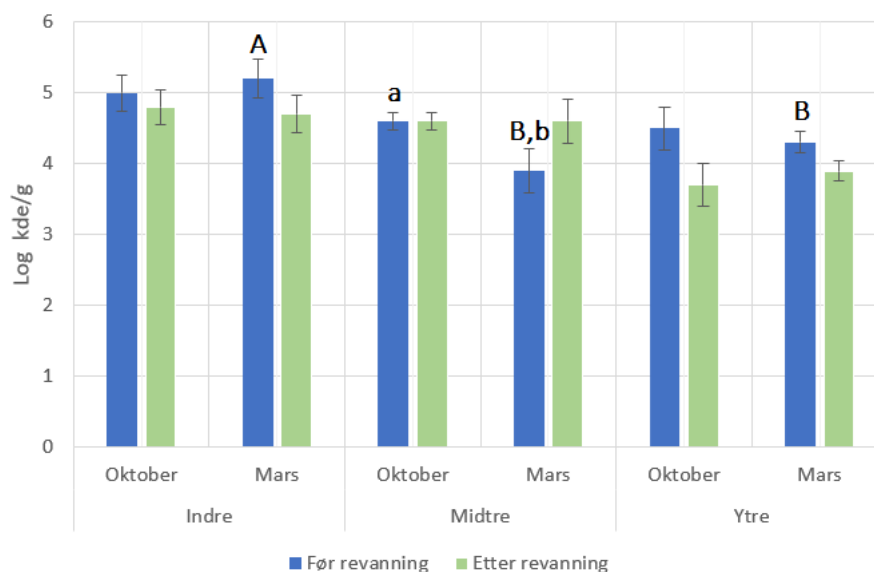


## 4 Resultat

### 4.1 Effekt av revanning, dyrkingslokasjon og sesong på sammensetning av mikrobielt samfunn i blåskjell

Den mikrobielle sammensetningen av blåskjell ble undersøkt ved å benytte kulturbaserte metoder hvor ulike vekstmedium ble brukt for å se hvordan revanning, lokasjon og sesong kunne påvirke dette.

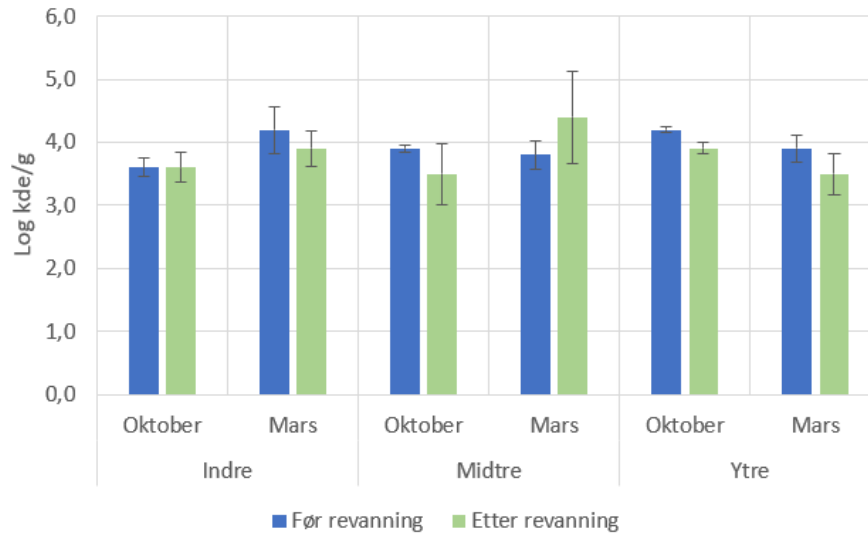
Totalt psykrotroft kimtall (PK) varierte fra  $3,9 \pm 0,32$  log kde/g til  $5,2 \pm 0,27$  log kde/g før revanning og  $3,7 \pm 0,16$  log kde/g til  $4,8 \pm 0,17$  log kde/g etter revanning (Figur 10). Det ble ikke påvist noen signifikant forskjell som funksjon av revanning i de seks ulike inndelingene av lokasjon og sesong ( $p > 0,05$ ). Sammenligning av PK i blåskjell før revanning viste at det i oktober ikke var signifikant forskjell mellom dyrkingslokalisasjonene ( $p > 0,05$ ), mens i mars var PK i skjell fra indre dyrkingslokasjon signifikant høyere fra midtre og ytre dyrkingslokasjon ( $p < 0,05$ ). Ved midtre dyrkingslokasjon var kimtallet i oktober signifikant høyere enn i mars før revanning, mens ingen signifikant forskjell ble funnet for de andre lokalitetene ( $p < 0,05$ ).



Figur 10: Kimtall ved påvisning av totalt psykrotroft kimtall i blåskjell før og etter revanning ved indre, midtre og ytre dyrkingslokasjon høstet i oktober og mars. Verdiene er oppgitt som gjennomsnittsverdier  $\pm$  SD ( $n=3$ ). Ulike små bokstaver (a-b) indikerer signifikante forskjeller mellom sesong ved oppgitt lokasjon, mens store bokstaver (A-B) viser signifikante forskjeller mellom lokaliteter ved angitt sesong.

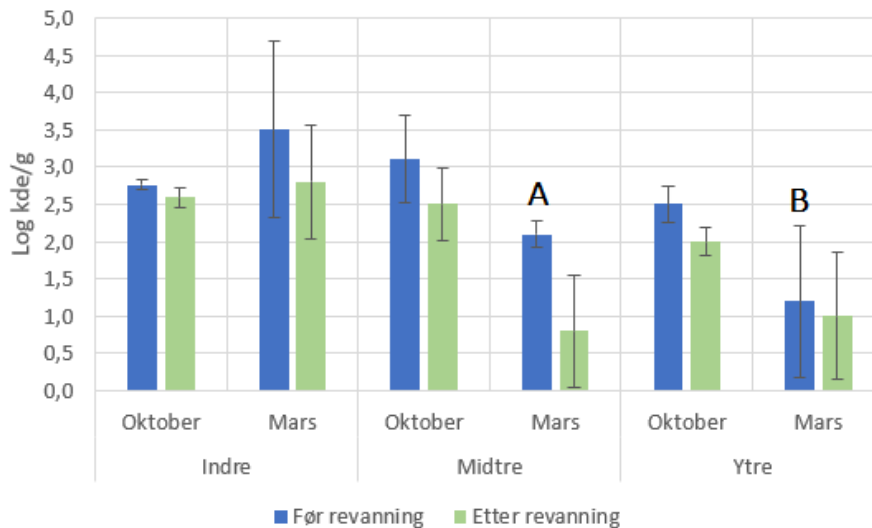
Det totale mesofile kimtallet varierte fra  $3,6 \pm 0,15$  log kde/g til  $4,2 \pm 0,37$  log kde/g før revanning og fra  $3,5 \pm 0,48$  log kde/g til  $4,4 \pm 0,73$  log kde/g etter revanning (Figur 11). Det ble

ikke påvist noen signifikant forskjell som funksjon av revanning i de seks ulike inndelingene ( $p > 0,05$ ) og ingen signifikant forskjell mellom de to ulike sesongene ( $p > 0,05$ ) eller mellom de ulike lokasjonene ( $p > 0,05$ ).



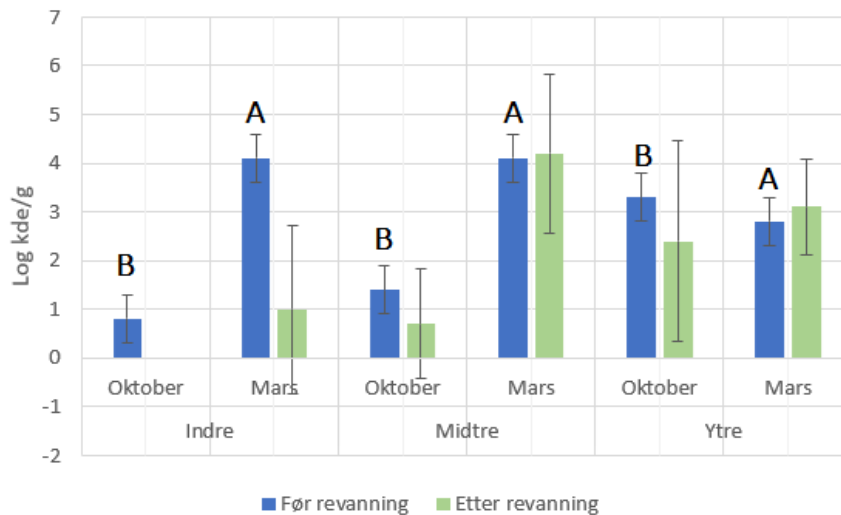
Figur 11: Kimtall ved påvisning av totalt mesofilt kimtall i blåskjell før og etter revanning ved indre, midtre og ytre dyrkingslokasjon høstet i oktober og mars. Verdiene er oppgitt som gjennomsnittsverdier  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

Konsentrasjonen av  $H_2S$  produserende bakterier (kvantifisert som sorte kolonier på jernagar) varierte fra  $1,2 \pm 1,02$  log kde/g til  $3,5 \pm 1,18$  log kde/g før revanning og fra  $0,8 \pm 0,75$  log kde/g til  $2,8 \pm 0,77$  log kde/g etter revanning (Figur 12). Revanningen hadde ingen signifikant reduserende effekt på mengden  $H_2S$  produserende bakterier i blåskjellene ( $p > 0,05$ ). Kimtallet ved midtre dyrkingslokasjon var signifikant høyere enn ytre dyrkingslokasjon i mars ( $p < 0,05$ ), mens kimtallet i skjell fra de tre ulike dyrkingslokasjonene i oktober var ikke signifikant forskjellige ( $p > 0,05$ ). Det var ingen signifikant forskjell i kimtall mellom de to ulike sesongene for alle dyrkingslokasjoner før revanning ( $p > 0,05$ ).



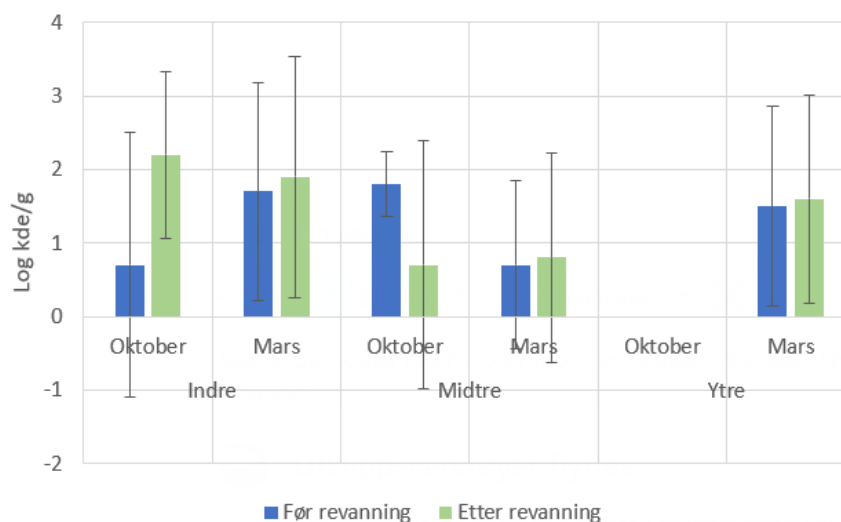
Figur 12: Kimtall ved bestemmelse av  $H_2S$  produserende bakterier i blåskjell før og etter revanning ved indre, midtre og ytre dyrkingslokasjon høstet i oktober og mars. Verdiene er oppgitt som gjennomsnittsverdier  $\pm$  SD. Ulike store bokstaver (A-B) viser signifikante forskjeller mellom lokaliteter ved angitt sesong.

Kimtallet ved påvisning av presumptive *Aeromonas* varierte fra  $0,8 \pm 1,4$  log kde/ml til  $4,1 \pm 2,37$  log kde/g før revanning og fra ikke påvist kimtall til  $4,2 \pm 1,63$  log kde/g etter revanning (Figur 13). *Aeromonas* ble ikke påvist i alle parallelle prøver, og etter revanning i oktober ble det kun påvist i 1 av 3 parallelle prøver ved midtre og i 2 av 3 parallelle prøver fra ytre dyrkingslokasjon. Presumptive *Aeromonas* ble kun påvist i 1 av 3 parallelle prøver før revanning i oktober i prøver fra indre og midtre dyrkingslokasjon. I mars ble det påvist i 1 av 3 ved indre dyrkingslokasjon etter revanning og ved de andre dyrkingslokasjonene var det stor variasjon av kimtallet ved parallellene. Revanningen hadde ingen signifikant reduserende effekt på mengden av presumptive *Aeromonas* i blåskjellene ( $p > 0,05$ ). Ingen signifikant forskjell i konsentrasjon av presumptive *Aeromonas* ble påvist mellom dyrkingslokasjoner, verken i mars eller i oktober ( $p > 0,05$  for begge). Konsentrasjonen av presumptive *Aeromonas* for alle de tre dyrkingslokasjonene sett under ett var signifikant høyere i mars enn i oktober ( $p < 0,05$ ).



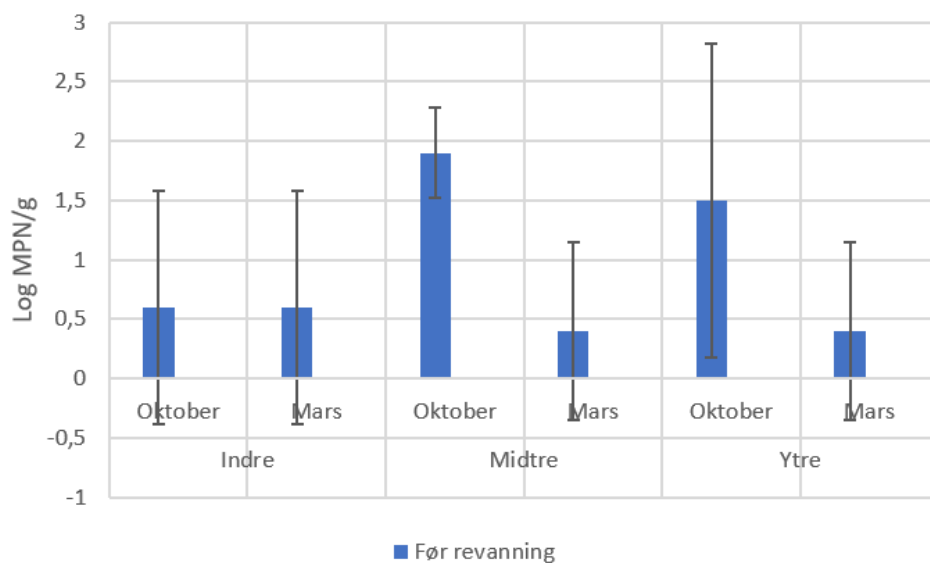
Figur 13: Kimtall ved påvisning av presumptive *Aeromonas* i blåskjell før og etter revanning ved indre, midtre og ytre dyrkingslokasjon høstet i oktober og mars. Verdiene er oppgitt som gjennomsnittsverdier  $\pm$  SD. Ulike store bokstaver (A-B) viser signifikante forskjeller sesonger ved samlet verdier for lokaliteter.

Ved påvisning av presumptive *Vibrio* varierende kimtallet fra ikke påvist til  $1,8 \pm 0,44$  log kde/g før revanning og fra ikke påvist kimtall til  $2,2 \pm 1,13$  log kde/g etter revanning (Figur 14). *Vibrio* ble ikke påvist i alle paralleller, og i oktober ble det påvist i 1 av 3 paralleller ved indre lokasjon før revanning og midtre lokasjon etter revanning, mens hos midtre lokasjon før revanning ble det påvist i 2 av 3 paralleller. I mars ble det påvist presumptive *Vibrio* i 2 av 3 paralleller blant alle, bortsett fra midtre dyrkingslokasjon både før og etter hvor det ble påvist kimtall i 1 av 3 paralleller. Det ble ikke påvist noen signifikant forskjell som funksjon av revanning i de seks ulike inndelingene ( $p > 0,05$ ) og ingen signifikant forskjell i presumptive *Vibrio* mellom de to ulike sesongene ( $p > 0,05$ ) eller mellom de ulike lokasjonene ( $p > 0,05$ ).



Figur 14: Kimtall ved påvisning av presumptive *Vibrio* i blåskjell før og etter revanning ved indre, midtre og ytre dyrkingslokasjon høstet i oktober og mars. Verdiene er oppgitt som gjennomsnittsverdier  $\pm$  SD.

Det ble påvist presumptive *E. coli* mellom  $0,4 \pm 0,75$  log MPN/g og  $1,9 \pm 0,38$  log MPN/g før revanning (Figur 15). *E. coli* ble ikke påvist i alle paralleller, da det i oktober før revanning ble påvist i 1 av 3 paralleller ved indre dyrkingslokasjon, mens for ytre dyrkingslokasjon ble presumptive *E. coli* påvist i 2 av 3 paralleller. Før revanning i mars ble *E. coli* påvist i 1 av 3 paralleller ved alle dyrkingslokasjonene. I oktober ved midtre dyrkingslokasjon ble det funnet signifikant reduksjon i konsentrasjonen av *E. coli* som funksjon av revanning ( $p < 0,05$ ). *E. coli* ble ikke påvist etter revanning hos noen av lokasjonene og sesongene. Det ble ikke påvist forskjell i mengde *E. coli* mellom dyrkingslokasjonene ( $p > 0,05$ ) eller mellom de to sesongene ( $p > 0,05$ ).



Figur 15: Påvisning av presumptive *E. coli* i blåskjell før revanning ved indre, midtre og ytre dyrkingslokasjon høstet i oktober og mars ved bruk av MPN-metoden. Verdiene er oppgitt som gjennomsnittsverdier ± SD.

## 4.2 Identifisering av mikrobielt samfunn i blåskjell ved bruk av dyrkingbasert metode

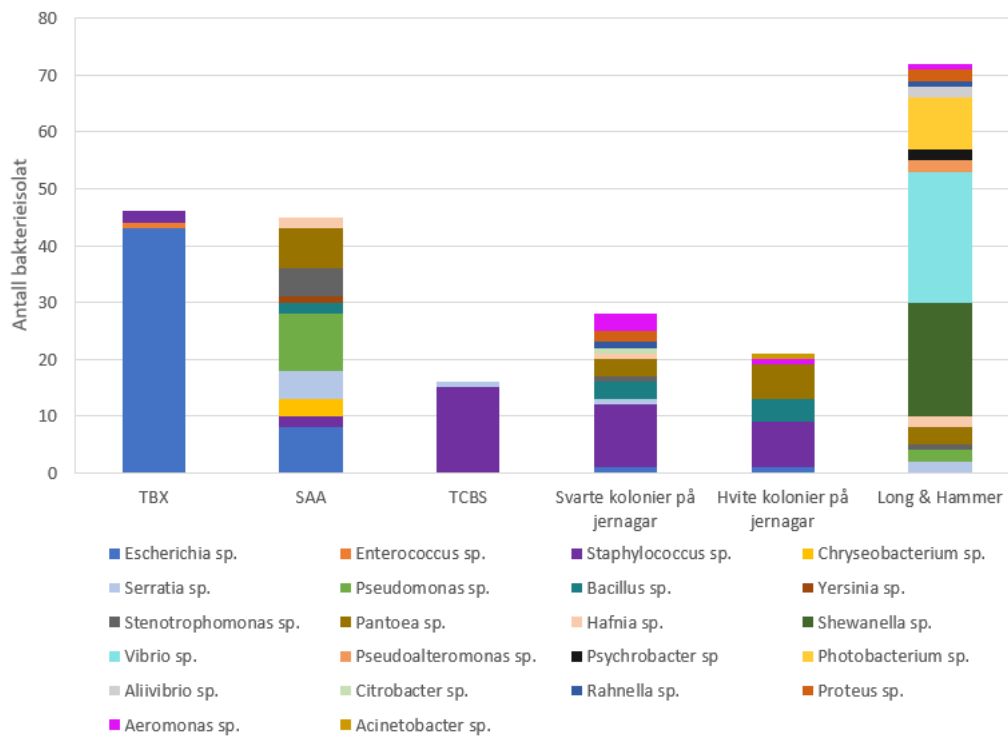
Fra begge prøveuttak ved alle de tre lokalitetene, både før og etter revanning ble totalt 228 bakterieisolater plukket fra fem ulike dyrkingsmedier og identifisert ved sekvensering av 16S rRNA genet (Tabell 6).

Tabell 6: Antall isolater fra de tre dyrkingslokasjonene (indre, midtre og ytre) i oktober og mars, samt før og etter revanning.

	Oktober			Mars		
	Indre	Midtre	Ytre	Indre	Midtre	Ytre
<b>Før revanning</b>	11	25	49	17	18	20
<b>Etter revanning</b>	9	11	23	17	10	18
<b>Totalt antall kolonier</b>	20	36	72	34	28	38
	128			100		

Identifiseringen viste at de ulike dyrkingsmediene, både generelle og selektive medier, støttet vekst av flere bakterieslekter (Figur 16). Av de 72 isolatene fra Long & Hammer agar ble 14 slekter identifisert. De dominerende slektene var *Vibrio sp.* (32 %), *Shewanella sp.* (27 %) og *Photobacterium sp.* (12 %) Fra jernagar ble det identifisert tolv ulike slekter fra de 49 isolatene, hvor det ble identifisert elleve slekter av sorte kolonier og seks slekter av hvite kolonier. Blant de sorte koloniene var det identifisert flest av *Staphylococcus sp.* (39 %), og 3 % av hver av slektene *Aeromonas sp.*, *Bacillus sp.* og *Pantoea sp.* Blant de hvite koloniene på jernagar ble 38% identifisert som *Staphylococcus sp.*, 28 % som *Pantoea sp.* og 14 % som *Bacillus sp.*

Blant de 45 bakterieisolatene plukket fra SAA ble ti slekter identifisert hvor 22% av de var *Pseudomonas sp.*, 17 % *Escherichia sp.* og 15 % *Pantoea sp.* Både gule og hvite kolonier ble plukket fra mediet. Fra TBX-agar ble det isolert 46 bakterieisolater hvor det ble identifisert tre slekter, som ble detektert ved blågrønne kolonier. *Escherichia* ble identifisert for 94% av isolatene, mens *Staphylococcus sp.* og *Enterococcus sp.* med henholdsvis 4 % og 2 %. Av de 16 bakterieisolatene fra TCBS ble det identifisert to slekter, hvor 94 % var *Staphylococcus sp.* og 6 % var *Serratia sp.* Kolonier isolert fra mediet var gule med lyssone og grønne kolonier.

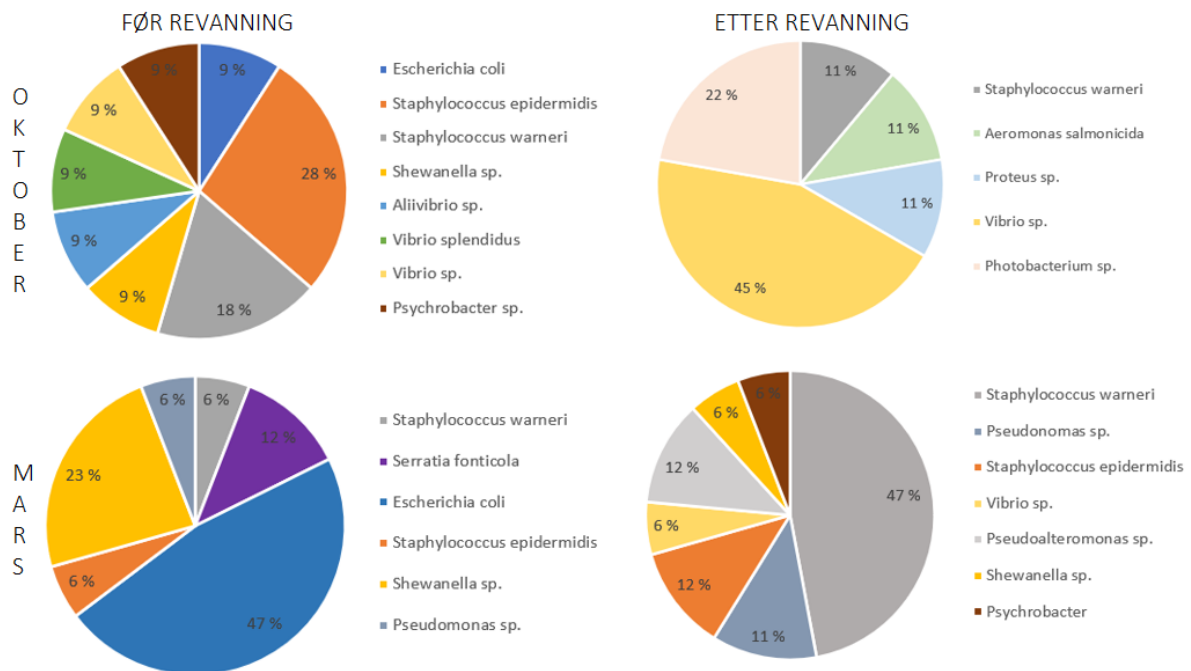


Figur 16: Identifisering av kolonier fra TBX-agar, SAA, TCBS agar, svarte kolonier på jernagar, hvite kolonier på jernagar og Long & Hammer.

Av de identifiserte isolatene var totalt 54 isolater plukket fra indre dyrkingslokasjon før og etter revanningen ved de to sesongene (Figur 17). Blant elleve isolater før revanning i oktober ble seks slekter identifisert hvor *Staphylococcus* (49 %) dominerte med slektene *Staphylococcus epidermidis* (28 %) og *Staphylococcus warneri* (18%). Etter revanning i oktober ble det identifisert fem slekter fra ni isolater med *Vibrio sp.* (45 %) og *Photobacterium* (22 %) som dominerende slekter. Blant de 17 isolatene før revanning i mars ble fem slekter identifisert, hvor arten *E. coli* (47 %) og uidentifiserte arter av *Shewanella sp.* (23 %) dominerte. Etter revanning i mars ble det identifisert seks slekter blant 17 isolat dominerende av *Staphylococcus* (59 %) med artene *S. warneri* (47 %) og *S. epidermidis* (12 %).

Ved begge sesongene ble *E. coli*, *S. epidermidis*, *S. warneri* og uidentifiserte arter av *Shewanella* identifisert. I oktober ble slekten *Vibrio* identifisert i mindre grad før revanning (18 %) enn etter revanning (45 %), mens i mars var den kun identifisert etter revanning (6 %). *S. epidermidis* ble kun identifisert før revanning (28 %) i oktober, mens i mars ble den identifisert både før (6 %) og etter revanning (12 %). *E. coli* ble identifisert i større grad i mars (47 %) enn i oktober (9 %) før revanning. I oktober ble *A. salmonicida*, *Proteus spp.* og

*Photobacterium spp.* bare identifisert etter revanning. *Vibrio spp.*, *Pseudoalteromonas spp.* og *Psychrobacter spp.* ble bare identifisert etter revanning.



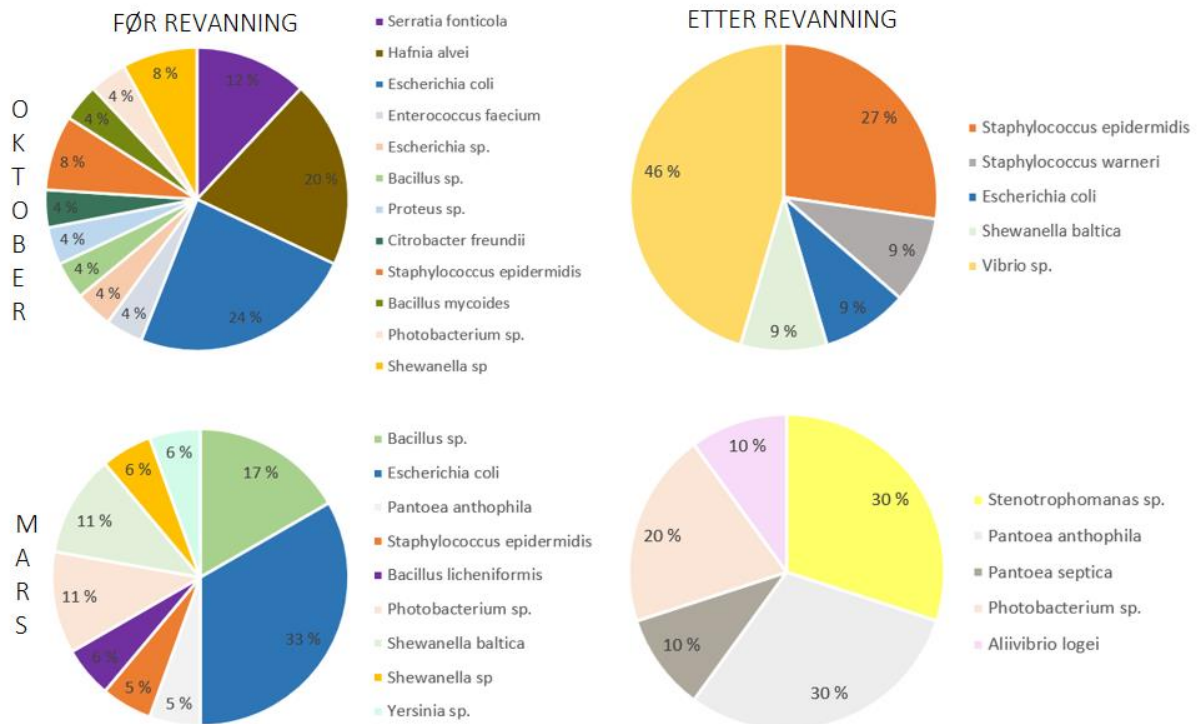
Figur 17: Sektordiagram av identifiserte isolat fra indre dyrkingslokasjon før (n=28) og etter revanning (n=26) i oktober og mars.

Totalt 64 isolater ble identifisert fra midtre dyrkingslokasjon fra før og etter revanningen ved de to sesongene (Figur 18). Blant de 25 isolatene fra før revanning i oktober ble ti slekter identifisert, hvor *Escherichia sp.* (28%), med arten *E. coli* (24%) og slekten *Hafnia sp.* (20%) dominerende. Etter revanning i oktober ble fire slekter identifisert fra elleve isolater med de dominerende slektene *Vibrio sp.* (46%) følgende av *Staphylococcus sp.* (36%) med artene *S. epidermidis* (27%) og *S. warneri* (9%). Blant de 18 isolatene fra før revanning i mars ble det identifisert syv slekter, med *Escherichia* som dominerende slekt med arten *E. coli* (33%) og *Bacillus* (23%). Etter revanning i mars ble ti isolater identifisert med fire slekter med *Pantoea sp.* (40%) som dominerende slekt med artene *P. anthophila* (30%) og *P. septica* (10%), samt slekten *Stenotrophomonas sp.* (30%).

Ved begge sesonger før revanning ble artene *E. coli* og *S. epidermidis* identifisert, samt uidentifiserte arter av *Bacillus sp.*, *Photobacterium sp.* og *Shewanella sp.* I oktober ble *S. epidermidis* identifisert i større grad etter revanning (27%) enn før revanning (8%). *E. coli* ble bare identifisert i mindre grad etter revanning ved begge sesongene. I oktober ble *Vibrio sp.*



bare identifisert etter revanning. I mars ble *Stenotrophomonas sp.*, *P. septica* og *Aliivibrio logei* bare identifisert etter revanning, mens de to andre identifisert etter revanning hadde lavere forekomst før revanning.

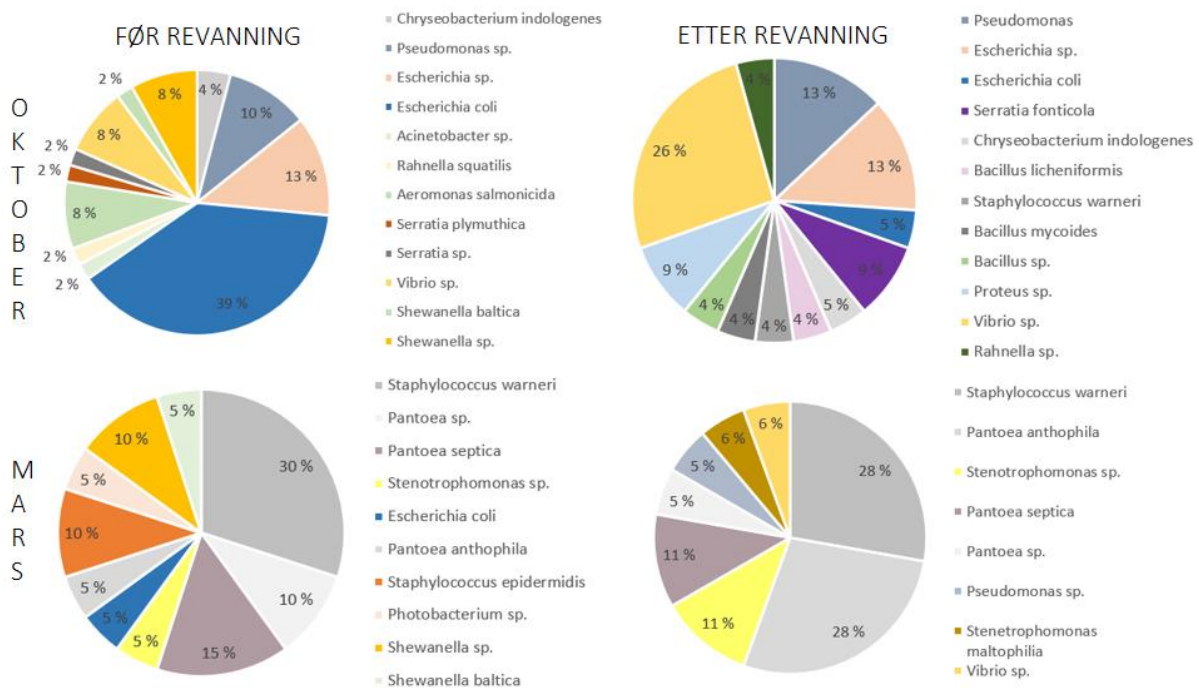


Figur 18: Sektordiagram av identifiserte isolat fra midtre dyrkingslokasjon før (n=43) og etter revanning (n=21) i oktober og mars.

Fra ytre dyrkingslokasjon ble det isolert 110 bakterieisolater fra før og etter revanning (Figur 19). I oktober før revanning ble ni ulike slekter av 49 isolater identifisert hvor *Escherichia sp.* (52 %) var dominerende med *E. coli* (39 %). Etter revanning i oktober ble 23 isolater identifisert som ni slekter med *Vibrio sp.* (26 %) og *Escherichia sp.* (18 %) som dominerende slekter. I mars før revanning ble seks slekter identifisert blant 20 isolater hvor *Staphylococcus sp.* (40 %) dominerte med *S. warneri* (30 %) og *S. epidermidis* (10 %), samt høy forekomst av *P. septica* (15 %). Etter revanning ble fire slekter identifisert hvor 18 isolater resulterte i identifikasjon av seks slekter hvor den dominerende var *Pantoea sp.* med arten *P. anthophila* (28 %), men også *S. warneri* (28 %).

Ved begge sesongene ble det påvist *E. coli*, *S. baltica* og uidentifiserte arter av *Shewanella sp* før revanning. I oktober ble *Vibrio sp.* identifisert i større grad etter revanning (26 %) enn før revanning (8 %), mens for *E. coli* ble det identifisert mindre etter revanning (5 %) enn før

revanning (39 %). I mars ble *P. anthophila* påvist i større grad etter revanning (28%) enn før revanning (5 %).

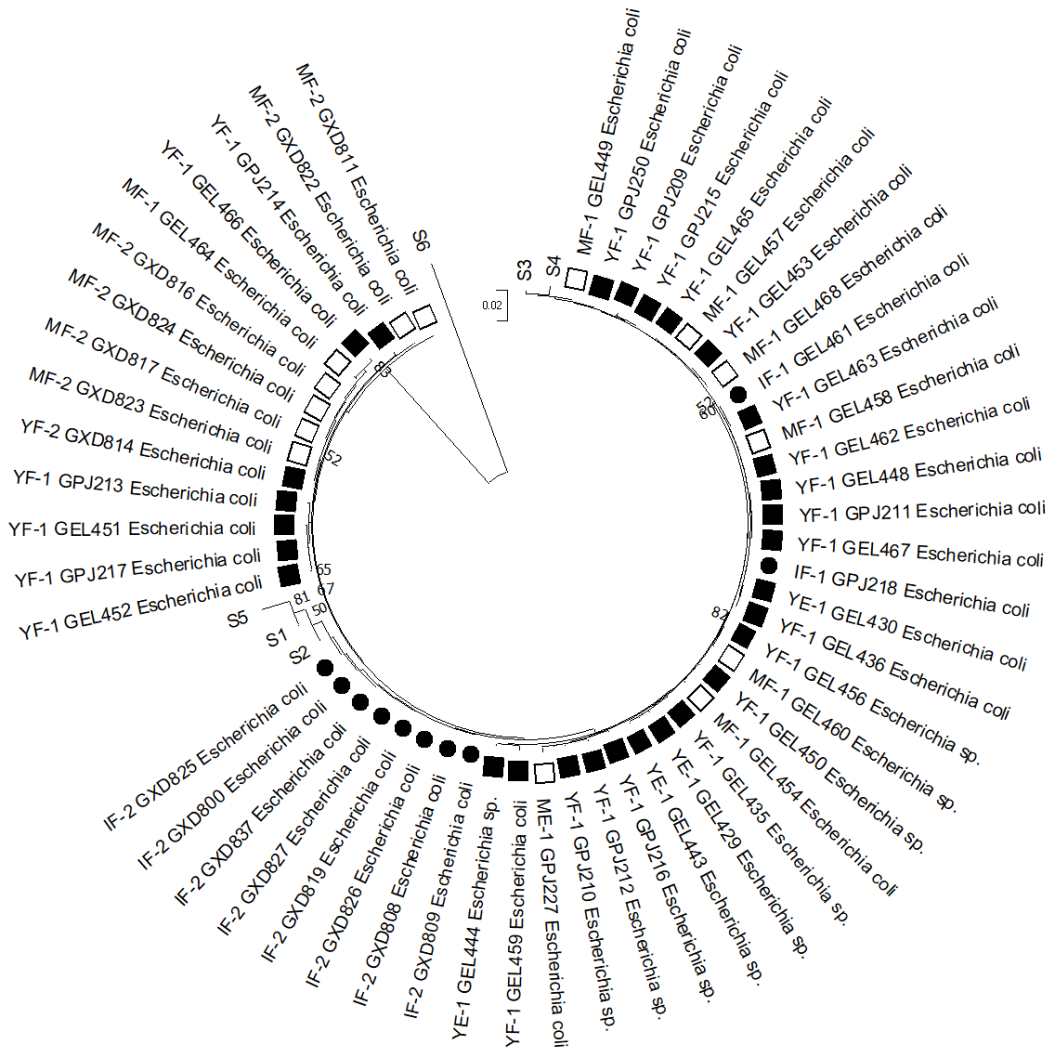


Figur 19: Sektordiagram av identifiserte isolat fra ytre dyrkingslokasjon før (n=69) og etter revanning (n=41) i oktober og mars.

#### 4.3 Fylogenetisk analyse basert på *Escherichia* arter

Et fylogenetisk tre (Neighbor-joining tre) ble konstruert for å se på slektskapet mellom sekvensene til isolater identifisert som *Escherichia spp.* uten nærmere artsidentifikasjon (10) og sekvenser identifisert som *E. coli* (43) (Figur 20). Referansestammene S1, S2, S3, S4, S5 ble brukt og *Enterococcus faecium* (S6) (Tabell 4) ble brukt som ut-gruppe i den fylogenetiske analysen. Det fylogenetiske treet viste tre hovedklynger i tillegg til ut-gruppen. Den første klyngen grupperte seg med referansestammene S3 (*E. fergusonii*) og S4 (*E. albertii*) bestående av 18 *E. coli*-isolat. Ved den andre hovedklyngen grupperte alle *Escherichia sp.* isolatene og 11 *E. coli*-isolater seg nærmest referansesekvensene S1 (*E. coli*), S2 (*E. coli*) og S5 (*E. marmotae*). Den tredje klyngen bestående av 14 *E. coli*-isolater grupperte seg ikke nær noen av referansesekvensene. Lengden av greinene viser små forskjeller mellom sekvensene og de lave bootstrapverdiene (< 83 %) gir stor usikkerhet om treet struktur. Isolatene fra indre

dyrkingslokasjon grupperte seg sammen, mens isolatene fra midtre og ytre var mer fordelt på de tre hovedklyngene.

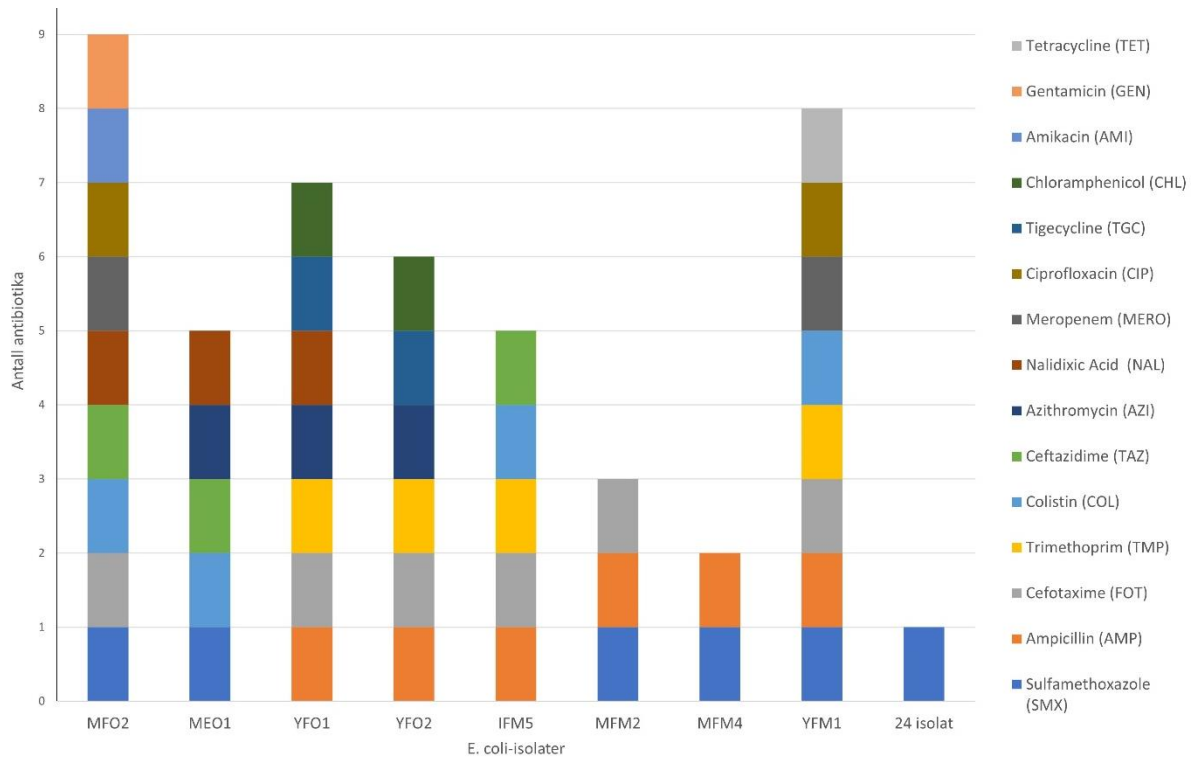


Figur 20: Sirkulært fylogenetisk tre (neighbour-joining) med 1000-bootstrap replikasjoner for 16S rRNA gensekvenser fra 53 isolater identifisert som *Escherichia sp.* og *E. coli* med fem referansestammer og *E. faecium* som utgruppe. Det fylogenetiske treet viser bootstrap-verdier >50 %. Symboler i indre sirkel viser isolatenes opprinnelse: Indre (svart runding), midtre (hvit firkant) og ytre (svart firkant) dyrkingslokasjon.

#### 4.4 Antibiotikaresistens hos *Escherichia coli*

Isolater identifisert som *E. coli* (n=34), fordelt på *E. coli* isolat (n=23) i oktober (Tabell 7) og *E. coli* isolat (n=11) fra mars (Tabell 8) (Vedlegg A), ble screenet for resistens mot et panel med 15 antibiotika. Referansestammen CCUG 17620 var innenfor de oppgitte MIC-konsentrasjonene (EUVSEC3). Blant de 34 isolatene var 32 (94 %) av de resistente mot minst en type antibiotika og syv (21 %) var resistent mot to eller flere antibiotika. De isolatene som var resistente mot minst to typer antibiotika var MFO2, MEO1, YFO1 og YFO2 som ble isolert fra blåskjell fra oktober, mens isolatene fra mars ble det funnet blant isolatene IFM5, MFM2, MFM4 og YFM1. Isolatet MFO2 var resistent mot ni ulike antibiotika. Ni ulike resistensprofiler ble observert, hvor den vanligste kombinasjonen av resistens var ampicillin, ceftazidime og trimethoprim som ble observert i fire av isolatene. Resistens mot betalaktam-antibiotika ble observert i åtte isolater (24%).

Det ble observert resistens mot alle 15 antibiotika som ble testet. Det ble påvist resistens mot cefalosporiner som cefotaxime (18 %) og ceftazidime (9 %) blant *E. coli*-isolatene. 6 % av *E. coli*-isolatene hadde også resistens mot blant karbapenemer som meropenem. Forekomsten av antibiotikaresistens i isolatene var følgende for sulfamethoxazole (85 %), ampicillin (18 %), trimethoprim (18 %), colistin (12 %), azithromycin (9 %), nalidixic acid (9 %), meropenem (6 %), ciprofloxacin (6 %), tigecycline (6 %), chloramphenicol (6 %), amikacin (3 %), gentamicin (3 %) og tetracycline (3 %).



Figur 21: Sammensetningen av hvilke antibiotika E. coli-isolatene er resistente mot blant de 15 ulike typene antibiotika. Isolater med resistens mot flere typer antibiotika (n=8), isolater som er resistente mot en type antibiotika (n=24) og isolater som ikke var resistente mot noen av antibiotikaene (n=2).

## 5 Diskusjon

Forsøket ble satt opp for å studere effekten av revanning, dyrkingslokasjon og på det mikrobielle samfunnet i blåskjellene. En mikrobiell prøvetaking for totalt psykrotroft kimtall, totalt mesofilt kimtall med H<sub>2</sub>S produserende bakterier, presumptive *Aeromonas*, presumptive *Vibrio* og presumptive *E. coli* ble gjennomført. I Kijewska et al. (2023) påpekes det at gram-negative bakterier som *Pseudomonas spp.*, *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Shewanella spp.* og *E. coli* er relevante patogene mikroorganismer med tanke på mattrygghet i blåskjell, men også andre bakterier i det marine miljøet og antibiotikaresistente bakterier kan akkumuleres. Enteriske virus som norovirus og Hepatitt-A virus er også viktige smittestoffer som kan forekomme i kloakk og kan true mattryggheten og er assosiert med utbrudd ved konsum av skjell (Manso & Romalde, 2013).

### 5.1 Effekt av revanning på det mikrobielle samfunnet i blåskjell

Å studere det mikrobielle samfunnet etter revanning ble gjennomført for å undersøke om bakteriekonsentrasjonen ble redusert som effekt av revanning og om sammensetningen av det mikrobielle samfunnet endret seg. Formålet med revanning er å redusere antallet fekale mikroorganismer i blåskjell, som *E. coli* (FAO, 2010). Før revanning hadde fem av seks prøver en konsentrasjon under 230 *E. coli* / 100 g, som er grensen for å bli klassifisert som A-område (Mattilsynet, 2019a), mens midtre dyrkingslokasjon overskrider denne verdien i oktober med 266 *E. coli* / 100 g, som tyder på at blåskjellene er høstet fra minst et B-klassifisert område (Mattilsynet, 2019a). Revanningen i denne studien viste at minst 24 timer revanning med stor sannsynlighet reduserte mengden av *E. coli* betraktelig. En signifikant reduksjon for bare midtre dyrkingslokasjon i oktober kan komme av det høye standardavviket ved påvisningen. Dore og Lees (1995) observerte at en revanning på 12 timer ved bruk av filtrert og UV-behandlet sjøvann fjernet over 99 % av nivået av *E. coli* i blåskjell. En studie av Martínez et al. (2009) viste at en revanning ved temperatur på 14-18°C, 5,5 mg/liter oppløst oksygen, saltholdighet over 30 PSU (Practical Salinity Unit) og en turbiditet mindre enn 15 nephelometric turbiditetseenheter var effektiv ved eliminering av patogene bakterier og reduksjon av virusinnholdet i skalldyr.

Revanningen viste ikke en signifikant reduksjon av presumptive *Vibrio*, presumptive *Aeromonas*, H<sub>2</sub>S produserende bakterier, totalt mesofilt kimtall og totalt psykotroft kimtall i dette forsøket. Karakteriseringen viste en lavere forekomst av artsdiversiteten etter revanning, og ved noen dyrkingslokasjoner og sesonger ble en reduserende eller en økende observert. Ved karakterisering av det mikrobielle samfunnet ble det identifisert høyere andel av *Vibrio spp.* etter revanning. Martínez et al. (2009) undersøkte effekten av revanning av blåskjell kontaminert av blant annet psykotrofe bakterier som *Aeromonas spp.*, *Vibrio spp.* og *E. coli*, hvor det ble funnet en signifikant reduksjon av alle bortsett fra *Vibrio spp.* ved en revanning på 42 og 48 timer. FAO (2010) påpeker også at revanning har mindre effekt marine *Vibrio spp.* Tidligere studier av revanningseffekten av *V. vulnificus* og *V. parahaemolyticus* i levende østers viser seg å være tilstrekkelig ved fire til seks dager ved lave temperaturer, høy saltholdighet og med rennende vann (Campbell, Chouljenko & Hall, 2022). I denne oppgaven ble *A. salmonicida* ble identifisert ved en lokasjon før revanning og en annen lokasjon etter revanning. I artikkelen Starliper (2001) ble revanningseffekten av *A. salmonicida*, undersøkt i muslingen *Amblema plicata* noe som resulterte i en reduksjon på 70 % etter 24 timer.

En revanningsstudie fra Egypt av muslingen *Paphia undulata* ble gjennomført for å se på revanningseffekten av patogenene *Vibrio sp.*, *Shigella sp.*, *E. coli* og *Salmonella sp.* En revanning på 24 timer resulterte i henholdsvis en prosentvis reduksjon på 75, 31, 68 og 36 % sammenlignet med før revanning. Etter tre dager var *E. coli* fjernet, en reduksjon av *Vibrio* (3 %) og *Salmonella sp.* (8 %), og en økning for *Shigella sp.* (22 %) (El-Gamal, 2011). Dette bekrefter at revanningen kan senke konsentrasjonen av noen bakterier og økte konsentrasjonen av enkelte, noe som i den nevnte studien viste seg å være avhengig av tiden av revanningen. Selv om revanningen kan redusere og fjerne bakterielle stoffer i muslinger er den ikke så effektiv ved fjerning av virus, giftstoffer og tungmetaller. Tilstedeværelse av norovirus og Hepatitt-A virus kan være tilstede etter revanning og kan forårsake utbrudd dersom muslinger konsumeres rått, som stort sett bare er østers (Martinez-Albores et al., 2020).

Tiden for kloakkesponering er tidligere vist å ikke påvirke fjerning av *E. coli* i blåskjell ifølge Dore og Lees (1995). I Richards (1988) påpekes det at bakteriekonsentrasjonen påvirker revanningen, hvor skjell med høy forurensningsgrad tar lengre tid å rense. Hvor mye som slippes ut av skjellene har vist til å avta med tiden, som de forklarer med at bakteriene som

ikke er festet like godt blir fjernet først, mens de festede blir fjernet saktere. I denne oppgaven ble det påvist en konsentrasjon av presumptive *E. coli* før revanning på  $1,9 \pm 0,38$  log MPN/g og  $1,5 \pm 1,32$  log MPN/g i oktober henholdsvis ved midtre og ytre dyrkingslokasjon. Isolater som ble identifisert fra SAA og jernagar ble identifisert som *E. coli* etter revanning ved samme lokasjoner i oktober. Dette kan ha en sammenheng med hvor stor effekten av revanningen er ved ulike bakteriekonsentrasjoner. Det kan være at revanningen ikke har vært tilstrekkelig ved fjerning av *E. coli* og dersom en lengre revanning hadde blitt gjennomført hadde *E. coli* mest sannsynlig blitt fjernet. MPN-metoden er en standardisert metode for påvisning av *E. coli* i blåskjell og dermed kan usikkerheter i forsøket ført til at det ikke ble påvist *E. coli* etter revanning på TBX-agar. Ved karakterisering av isolatene ble det observert en reduserende effekt av *Shewanella*, *Hafnia alvei* og *Serratia fonticola* som effekt av revanning. I studien Odeyemi, Burke, Bolch og Stanley (2019) påpekes det at *Shewanella baltica* blir assosiert med ødeleggelse av sjømat og at mikrobiotaen i blåskjellet før pakking i modifisert atmosfære er avhengig av kvaliteten på produktet. De ble funnet ut at *Shewanella* ikke utgjør noen trussel siden den lett blir fjernet med revanning.

Uidentifiserte arter av *Vibrio sp.* ble påvist i større grad etter revanning i oktober ved alle tre dyrkingslokasjoner. Dette kan tyde på at bakterien tar lengre tid å fjerne med revanning og at den er godt festet i blåskjellet. Det er ikke ønskelig at *Vibrio sp.* blir påvist etter revanning i blåskjell siden noen av artene kan være patogene, slik som *Vibrio splendidus* som ble påvist før revanning. En høyere forekomst etter revanning ble også påvist for *S. warneri* ved indre dyrkingslokasjon og *P. anthophila* ved ytre dyrkingslokasjon i mars. Ved midtre dyrkingslokasjon ble alle isolatene identifisert i større grad etter revanning. En høyere konsentrasjon av bakterielle smittestoff etter revanning kan komme av rekontaminering av blåskjellene dersom vannet ikke har blitt byttet ut (Rees & World Health, 2010). For at blåskjellene skal fjerne kontaminanter er det viktig å gjenopprette filterfôringsaktiviteten, noe som er avhengig av håndtering og fysiologiske omgivelser (Rees & World Health, 2010). En konsekvens av dette er at kontaminanter ikke blir skylt ut av gjeller og fordøyelsessystemet til blåskjellene slik at mulige mikroorganismer kan fortsette å vokse. En høyere forekomst etter revanning kan også ha sammenheng mellom hvilke kolonier som ble plukket fra vekstmediene og ved plukkingen gjøres et selektivt utvalg. Selv om plukkingen av kolonier fra de ulike vekstmediene ble prøvd å gjøre systematisk ved å dele generelle medier inn i sektorer og



plukke koloniene innenfor denne, ble kapasitet en begrensning. En jevn fordeling av antall kolonier fra før og etter revanning ved de ulike dyrkingslokasjonene i oktober og mars burde blitt gjennomført for et mer kvantitativt resultat.

Ved dyrkingsbasert metode ble det detektert store forskjeller på forekomsten av H<sub>2</sub>S produserende bakterier, presumptive *Aeromonas*, presumptive *Vibrio* og presumptive *E. coli*. Forskjeller i de tre parallellene har forårsaket det høye standardavviket, noe som gir en usikkerhet i forekomsten av bakteriene. At det er forskjeller innenfor de tre parallellene med blåskjell, viser variasjonen av filtrering og oppkonsentrering mellom blåskjellene. Dette sier noe om mattryggheten ved konsum av blåskjell og at det er lurt å teste flere paralleller av blåskjell for å gi et sikrere estimat for påvisning av kontaminanter.

## 5.2 Mikrobielt samfunn som effekt av dyrkingslokasjon og sesong

Blåskjellene ble høstet fra tre ulike dyrkingslokasjoner i en terskelfjord i oktober 2022 og mars 2023. Hensikten var å undersøke om sesong og dyrkingslokasjon påvirket det mikrobielle samfunnet. Siden det mikrobielle samfunnet i blåskjellene kan gjenspeile det mikrobielle samfunnet i havet (Baralla et al., 2021), ble blåskjell før revanning brukt for å undersøke dette. I Derome (2019) påpekes det at sammensetningen av mikrobiotaen i muslinger og miljøet varierer med lokasjon og sesong. Varierende nivåer av fekale koliforme bakterier har blitt observert av You et al. (2023) av muslinger ved kystlinjen i Canada. Forurensningen varierte med sesong da høyere forekomst av nedbør og snøsmelting, samt ved regioner med høyere menneskeaktivitet og dyrebestander førte til høyere nivåer av koliforme bakterier.

I denne studien ble det observert en signifikant høyere forekomst av totalt psykrotroft kimtall og H<sub>2</sub>S produserende bakterier ved to ulike lokasjoner i mars. Førstnevnte hadde høyest forekomst ved indre dyrkingslokasjon i forhold til de to andre lokasjonene, mens sistnevnte hadde høyere forekomst i midtre enn ytre dyrkingslokasjon. Grunnet trange innganger ved terskelfjorder er det lite utskiftning i vannet og kontaminert kan bli værende en stund (Statens, 2000), noe som muslingene kan filtrere og oppkonsentrere. Høyere temperaturer av øverste vannlag innerst kontra ytterst i en terskelfjord har blitt målt av (Dyb & Tuene, 2003). Vezzulli et al. (2012) viste at en økende temperatur på havoverflaten pekte mot en økning i

dominansen til marine *Vibrio spp.* og andre patogene bakteriearter ved forskning gjort på planktonassosiert bakteriesamfunn i Nordsjøen.

Identifiseringen viste en større diversitet av slekter ved ytre dyrkingslokasjon, følgende av midte og indre dyrkingslokasjon. Det var hyppigst forekomst av slektene innenfor familiene *Enterobacteriaceae* og *Vibrionaceae*. Andre familier som ble påvist i dette forsøket var blant annet *Aeromonadaceae*, *Moraxellaceae*, *Yersiniaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Shewanellaceae*, *Erwiniaceae* og *Staphylococcaceae*. En studie av Salgueiro et al. (2021) identifiserte også de fem førstnevnte familiene i muslinger. Forskningen ble gjennomført på tre ulike muslinger, inkludert blåskjell, ved tre dyrkingsanlegg ved kystlinjen sør for Portugal og et anlegg i sentrale deler av Portugal. Sammensetningen av mikrobiotaen i muslingene varierte mellom dyrkingslokasjoner fra samme region. Salgueiro et al. (2021) støttet hypotesen om at mikrobiotaen i muslinger blir påvirket av blant annet saltholdighet, mikrobiotaen i vannet, temperatur og livsstadier, men også miljøfaktorer som pH og oppløst oksygen (Derome, 2019). Flere forskningsstudier indikerer på at muslingenes mikrobiota kan reflektere økte konsentrasjoner av *Enterobacteriaceae* og *Aeromonadaceae* relatert til menneskeskapt påvirkning (Derome, 2019). Muslinger kan ha en mikrobiota som er sammensatt av forskjellige arter i slektene *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Photobacterium* og *Bacillus* (Zannella et al., 2017). I studien Salgueiro et al. (2021) ble slekter som *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Proteus* og *Staphylococcus* identifisert fra muslinger. Det er vist seg at muslinger som lever i forurensende vann har hyppigst forekomst av *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas* og *Acinetobacter* (Derome, 2019). De tre førstnevnte slektene er ifølge Martínez et al. (2009) en betydelig del av den mikrobielle sammensetningen av blåskjell dyrket langs kysten nordvest i Spania. De nevnte studiene har vist at det mikrobielle samfunnet til muslinger viser en stor diversitet av ulike slekter.

I denne studien ble det vist at *Escherichia sp.* og *Staphylococcus sp.* tilstedeværende ved alle dyrkingslokasjoner. Diversiteten blant dyrkingslokasjonen varierte, noe den også gjorde som effekt av sesong. Det mikrobielle samfunnet varierte som effekt av sesong for to av de dyrkingsbaserte metodene, da ble det påvist en signifikant høyere konsentrasjon av totalt psykotroft kimtall og presumptive *Aeromonas*, ved henholdsvis oktober og mars. Sesongvariasjonene for totalt psykotroft kimtall ble observert ved midtre dyrkingslokasjon og for presumptive *Aeromonas* sett under alle lokasjoner. I oktober varierte lufttemperaturen fra

6,4°C til 10,9°C mens temperaturen i mars varierte fra 4,0°C til 6,5°C, som vil si det generelt var varmere i oktober. Dette kan indikere på at et høyere totalt psykrotroft kimtall forekommer ved høyere temperaturer, mens presumptive *Aeromonas* ved lavere temperaturer. Forekomsten av mikroorganismer kan også skyldes filterhastigheten siden den øker ved temperaturer på 10-26°C, mens ved temperaturer under 5°C vil den senkes (Gosling, 2003). En høyere filtreringshastighet fører til at blåskjellene filtrerer mer vann og dermed kan en høyere konsentrasjon av kontaminanter oppstå i blåskjellene. Et mer presist estimat for å si om temperaturen kan ha påvirket mikrobiotaen i blåskjell hadde vært målinger av temperaturen i vannet. Karakteriseringen i denne oppgaven viste en høyere diversitet av slekter i oktober med syv flere slekter enn i mars ved alle dyrkingslokasjoner sett under ett. Slektene som vokste ved begge sesonger var *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Shewanella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* og *Photobacterium*.

Forekomsten av koliforme bakterier har vist seg å være høyere etter mye nedbør (Hernandez, Acedo & Dillon, 2020), da tilsig fra land og utslipp fra kloakk kan forekomme. Ved høsting av blåskjellene som ble brukt i denne oppgaven var det ingen store nedbørsmengder. Dette gjenspeiler også den relativt lave forekomsten av *E. coli* i blåskjellene. Innvirkningen av nedbør på *E. coli* konsentrasjoner ved forskjellige strender ble utført av Kleinheinz, McDermott, Hughes og Brown (2009), hvor seks av åtte lokasjoner ble påvirket av nedbør på 5 mm i løpet av en 24 timers periode. Dette viste at forekomsten av *E. coli* konsentrasjoner varierte fra ulike strender og at undersøkelser av hver strand er hensiktsmessig med hensyn til påvirkningen av nedbør.

For å få et bredere spekter av hvilke slekter som kan forekomme i marine miljø ble jernagar brukt for å påvise slekter som vokser ved høyere temperaturer, mesofile bakterier. Bakterier med svarte kolonier anses til å være H<sub>2</sub>S produserende, da noen slike bakterier er *Shewanella*, *Vibrio* (Doyle et al., 2013), samt *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Proteus* og *Yersinia* (Murros, 2022). I dette forsøket ble det funnet størst diversitet blant de svarte koloniene, hvor slektene *Escherichia* og *Proteus* var blant de artene som anses å være H<sub>2</sub>S produserende. At flere av slektene ble identifisert fra svarte og hvite kolonier, slik som *Staphylococcus*, kan komme av at noen arter produserer H<sub>2</sub>S. Det har blitt vist at *S. epidermidis* er H<sub>2</sub>S produserende og at *S. aureus* ikke er det (Aryal, 2022), men studiene på disse og for *S. warneri* er begrenset. I denne studien ble det identifisert flest *S.*

*epidermidis* og *S. warneri* som svarte kolonier, men også fra hvite kolonier. En forklaring på dette kan være at plukking av kolonier til rendyrking at eksempelvis en hvit koloni ble strøket ut istedenfor en svart. *Shewanella* som er en typisk H<sub>2</sub>S produserende bakterie (Doyle et al., 2013), ble ikke identifisert fra jernagar som svarte kolonier, men fra Long & Hammer, hvor 15 kolonier ble identifisert som dette.

Fra SAA ble det plukket flest kolonier som ikke var typiske *Aeromonas* kolonier, men også typiske kolonier som var gule med en lys sone. Det ble påvist slekter som *Pseudomonas* og *Escherichia*, men ikke *Aeromonas*, til tross for at denne ble identifisert fra Long & Hammer. Fra Long & Hammer ble det også identifisert *Vibrio*, noe som ikke ble identifisert fra TCBS. Kolonier som ble plukket fra TCBS var både gule kolonier med lyssone og grønne kolonier. Dette viser at tilstedeværelse av *Aeromonas* og *Vibrio* kan forekomme dersom det ikke blir påvist på SAA og TCBS, og dersom det er vekst på disse mediene er gir ikke det et sikkert estimat på at det er de to slektene. Påvisning av totalt psykrotroft kimtall ved Long & Hammer er det mediet som representerer diversiteten i blåskjell best.

### 5.3 Fenotypisk karakterisering av sekvenser

Basert på sekvenser som ble identifisert som *Escherichia sp.* og *E. coli* ved 16S rRNA ble det laget et fylogenetisk tre. Lave bootstrap-verdier på det fylogenetiske treet gir stor usikkerhet om treet struktur. Lengden av greinene på treet viser svært små forskjeller mellom sekvensene og basert på den fylogenetiske analysen kan ikke artsidentifikasjon til isolatene bekreftes. Den fylogenetiske analysen viste ingen tydelig gruppering av isolatene og dette bekrefter at 16S rRNA ikke er en god markør for fylogenetisk analyse av *Escherichia*.

16S rRNA-gensekvenser er det vanligste husholdningsgenet for å studere bakteriell fylogeni og taksonomi, da gener er tilstedeværende blant nesten alle bakterier. Bruken av dette genet er også forbundet med problemer ved identifisering på slektsnivå og artsnivå blant *Enterobacteriaceae* (Janda & Abbott, 2007). Bruken av andre proteinkodede husholdningsgener har vist en høyere ytelse ved identifikasjon av slekter og arter i *Enterobacteriaceae*, da *dnaJ* vist en høyere ytelse enn 16S rRNA, *tuf* og *atpD*. Grunnet en større sekvensvariasjon mellom artene i slekten gjør at proteinkodende husholdningsgener er mer egnet (McLean et al., 2019). Hong Nhung et al. (2007) dokumenterte at analyse av

familien *Enterobacteriaceae* ved dnaJ-sekvenser kunne identifisere på artsnivå og at det er en kraftig markør for fylogenetisk studie.

I denne studien ble flest *Escherichia sp.* påvist på TBX-agar, men også *Staphylococcus sp.* (4 %) og *Enterococcus sp.* (2 %), som blå kolonidannende enheter. Blant *Escherichia sp.* isolatene ble 86 % identifisert som *E. coli*. Sannsynligheten for at de fleste isolatene faktisk er *E. coli* avhenger av hvor selektiv TBX-agar er, som vil si at dersom den indikerer god selektering av *E. coli* på bekostning av andre *Escherichia* arter kan det sies at det med stor sannsynlighet er *E. coli*. Koliforme bakterier som *E. coli* er en gruppe av *Enterobacteriaceae* som er laktosefermenterende og de kan identifiseres av  $\beta$ -glukuronidaseaktivitet (Molina et al., 2015). Andre bakterier som ikke er målbakterier har vist seg å kunne ha høye nivå av enzymer som  $\beta$ -d-glukuronidase, noe som kan forstyrre påvisningen av målbakteriene. I *Enterobacteriaceae* familien har enzymet blitt funnet blant *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Yersinia* og *Rahnella* (Tryland & Fiksdal, 1998). Grevskott et al. (2016) undersøkte artsdiversiteten til MPN-metoden noe som resulterte i at 10 % av andre slekter i *Enterobacteriaceae*-familien ble identifisert som falsk-positive kolonier på TBX-agar, som var *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter* og *Enterobacter*. I den nevnte studien påpekes det at bruken av TBX-agar ikke kan brukes utelukkende for påvisning av *E. coli*. Til tross for at det har blitt bevist at andre slekter kan vokse på TBX-agar, har det også blitt vist at enzymet  $\beta$ -glukuronidase ikke har gitt falske negative reaksjoner ved påvisning av *E. coli* (Edberg & Kontnick, 1986).

TBX-agar blir brukt som bekreftelse for kulturrør som skifter farge fra lilla til gul, positive prøver, som skyldes laktosefermentering. Å fermentere laktose er en egenskap de fleste koliforme bakterier har, og ved bekreftelse av tilstedeværelsen av *E. coli* i vann og skaldyr blir en laktosefermentering ved 44°C blitt sett på som en bra metode (Tennant, Reid, Rockwell & Bynoe, 1961). I studien til Tennant et al. (1961) ble det påvist flere gasspositive tester for *E. coli* isolat, enn for isolat som er ikke-fekale ved 44°C. Det ble funnet ut at stammer av *Aerobacter* og *Citrobacter* kan ha en laktosefermentering ved 44°C.

#### 5.4 Forekomst av antibiotikaresistens i *Escherichia coli*

Forekomsten av antibiotikaresistens i *E. coli* ble undersøkt ved tre dyrkingslokasjoner i oktober og mars av blåskjell før og etter revanning. Å teste for antibiotikaresistente *E. coli* i blåskjell kan gi et godt bilde over forekomsten i det marine miljøet fordi blåskjellene filtrerer omgivelsene sine (Grevskott et al., 2017). Regelmessige testinger for antibiotikaresistens spesielt ved byer kan gi oppdatert kunnskap om hvordan forekomsten av resistens er lokalt (Grevskott, Ghavidel, Svanevik & Marathe, 2021). En oppdatering av nåværende status for antibiotikaresistente gener i det marine miljøet er viktig med tanke på rollen marine bakterier har som reservoar. En økning av antibiotikaresistente gen kan føre til økning av resistente patogene bakterier hos mennesker og dyr (Kijewska et al., 2023). En analyse av forekomsten av antibiotikaresistente bakterieisolater fra hele verden ble gjennomført av Albini et al. (2022), som viste til en generelt høy forekomst av antimikrobiell resistens hos *Aeromonas spp.*, etterfulgt av *Vibrio spp.*, *Salmonella spp.* og *E. coli* i marine miljø. Spesielt de to førstnevnte ble sett på som to viktige reservoar for antimikrobielle resistente gen.

*E. coli* og *Klebsiella pneumoniae* er to arter som forbindes med den høye produksjonen av utvidet beta-laktamase (ESBL), som vil si de har resistens mot bredspektrede cefalosporiner (Rossolini, D'Andrea & Mugnaioli, 2008). Det rapporteres om økende forekomst av ESBL i Norge innenfor og utenfor helseinstitusjoner, men forekomsten er fortsatt lav (Folkehelseinstituttet, 2019a), mens det i andre områder i Europa og Sør-Amerika er større forekomst (Rossolini et al., 2008). Ved behandling av *Enterobacteriaceae* infeksjoner blir behandling med cefalosporiner som inkluderer antibiotikaene cefotaxim, ceftazidim, ceftriaxone og cefepim brukt, dermed er resistensutvikling mot disse ikke ønskelig (Paterson, 2006). Grevskott et al. (2017) observerte resistens mot tredje generasjons cefalosporiner blant 7 % av *E. coli*-isolater fra kommersielle oppdrettslokaliteter og fra overvåkningsposisjoner i Norge ved perioden oktober 2014 til november 2015. I Grevskott et al. (2021) ble det undersøkt om resistensprofilene og mangfoldet av  $\beta$ -laktamaser var tilstedeværende i befolkningen og hvordan en mulig spredning av resistente *E. coli* til miljøet via kloakk i Bergen. Det ble funnet en tilstedeværelse av klinisk relevante karbapenemaser og ESBL-er, og det påpekes at funn av karbapenemaser i kloakk viser et behov for overvåkning av avløp for å forutsi fremtidige lokale utbrudd.

Ved testing av antibiotikaresistens i *E. coli*-isolat i denne studien viste at de åtte isolatene som var resistent mot flere enn en antibiotika, var også resistente mot minst en type betalaktam-antibiotika. 20 % av isolatene var resistente mot tredje generasjons cefalosporiner, med enten resistent mot ceftotaxime, ceftazidime eller mot begge, som var høyere enn det som ble nevnt for tidligere år. Det ble observert en mindre forekomst av resistens av ampicillin (18 %) og karbapenemer som meropenem (6 %). De fleste isolatene var resistente mot sulfamethoxazole. Trimetoprim-sulfametoksazol (TMP-SMX) er en utbredt antibiotika og det finnes bakteriearter over hele verden som har utviklet resistens mot denne, som blant annet *E. coli* (Pharm, 2022). I Vignaroli et al. (2016) ble det observert antibiotika resistens av *E. coli*-isolater med 17 % resistens mot ampicillin. Ampicillin er en type penicillin, og i Norge brukes det mest penicillin ved behandling av mennesker og dyr (NORM/NORM-VET, 2021), noe som gjør det relevant å teste for ampicillin i det marine miljøet. Vignaroli et al. (2016) viste også at 25,5 % av isolatene var resistente mot tetracycline. En studie av Grevskott et al. (2017) viste at 38 % av *E. coli*-isolat og andre i *Enterobacteriaceae* familiene var resistente mot minst en type antibiotika, mens 5 % viste multiresistens. Dette gjaldt blåskjell som ble høstet langs Norskekysten.

Antibiotikaresistens testingen i denne studien viste at ett ESBL-produserende *E. coli*-isolat var tilstedeværende etter revanning. Overføringen av resistente bakterier til mennesker kan reduseres ved varmebehandling av blåskjellene før konsum, men konsum av rått eller lett varmebehandlet kan føre til overføring (Jans et al., 2018). I en studie av Kausrud, Skjerdal, Johannessen, Ilag og Norström (2022) ble varmetoleransen til ESBL-produserende *E. coli* i blåskjell testet, og det viste seg å fjernes på samme måte som en ikke-ESBL *E. coli* ved høye nok temperaturer. Det ble også påpekt at en høy filterhastighet ved høyere temperaturer vil utgjøre en hot spot for akkumulering av patogene og antimikrobielle resistente bakterier fra det marine miljøet. Det er ikke ønskelig å konsumere blåskjell som inneholder antibiotikaresistente bakterier, fordi det er med på utviklingen og spredningen av antibiotikaresistens. Studier har vist at antibiotikaresistens hos patogene bakterier som *E. coli* blir fortere utviklet og spredt dersom den lokale temperaturen i havet øker med 10°C, som en konsekvens av klimaendringer (MacFadden, McGough, Fisman, Santillana & Brownstein, 2018; McGough, MacFadden, Hattab, Mølbak & Santillana, 2020). Forskningen tyder også på

at en økende befolkning også fører til økt problematikk knyttet til utviklingen av resistens (MacFadden et al., 2018).



## 6 Konklusjon

Hensikten med masteroppgaven var å studere effekten av revanning, dyrkingslokasjon og sesong på det mikrobielle samfunnet i blåskjell. Revanningen har med stor sannsynlighet redusert mengden av *E. coli* i blåskjell betraktelig. Karakterisering av bakterieisolatene viste en lavere forekomst av artsdiversitet etter revanning, og forekomsten av noen arter var høyere etter revanning. Karakterisering av mikrobielle samfunnet viste en varierende artsdiversitet som effekt av dyrkinglokasjon og sesong.

Den fylogenetiske analysen viste ingen tydelig gruppering av isolatene, og siden 16S rRNA genet ikke blir regnet som gunstig markør for artsidentifisering av *Escherichia* kan det ikke fastslås at det bare er tilstedeværelse *E. coli*-isolater. Testing av antibiotikaresistens er fremdeles interessant å studere i *Escherichia* med tanke på dens rolle i spredning av antibiotikaresistens i miljøet og oppover i næringskjeden. En forekomst ESBL-produserende *E. coli* i blåskjellene er bekymringsverdigg med tanke på utvikling og spredning av resistens. Ved økende temperaturer som resultat av global oppvarming blir det enda viktigere å overvåke forekomsten av patogene bakterier, spesielt *Vibrio spp.*, og antibiotikaresistente bakterier.

## 7 Veien videre

Ved karakterisering av bakterieisolater ved 16S rRNA blir det gjort et selektivt utvalg av hvilke kolonier som blir sekvensert. En pågående masteroppgave har gjennomført en 16S rRNA amplifikasjonssekvensering av ekstraherte DNA-prøver fra de samme blåskjellene. Dette kan brukes som komplimenterende arbeid da metoden ikke selekterer mikroorganismer og det kan gi et mer representativt bilde på forekomsten av mikroorganismer i blåskjell.

I denne studien ble funnet ut at det mikrobielle samfunnet varierte som funksjon av revanning, dyrkingslokasjon og sesong. For videre studier hadde det vært interessant å undersøke hvordan og hvilke faktorer som påvirker det mikrobielle samfunnet over tid ved ulike lokasjoner. En mer utbredt karakterisering av de gram-negative miljøbakteirene kunne blitt gjort ved gjennomførelse av en fylogenetisk analyse. Ved sekvensering ved 16S rRNA genet ble eksempelvis *Vibrio sp.* identifisert, hvor det hadde vært interessant å vite hvilke arter som forekom i blåskjellene.

## Referanseliste

- 853/2004. (2011). Europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr.853/2004 om fastsettelse av særlige hygieneregler for næringsmidler av animalsk opprinnelse (71/909).
- 854/2004. (2011). Europaparlaments- og rådsforordning (EF) nr. 854/2004 om fastsettelse av særlige regler for gjennomføringen av offentlig kontroll av produkter av animalsk opprinnelse beregnet på konsum.
- 1881/2006. (2014). Kommisjonsforordning (EF) nr.1881/2006 om fastsettelse av grenseverdier for visse forurensede stoffer i næringsmidler.
- Albini, E., Orso, M., Cozzolino, F., Sacchini, L., Leoni, F. & Magistrali, C. F. (2022). A systematic review and meta-analysis on antimicrobial resistance in marine bivalves.
- Andrews, K. (2013). Filter-feeding in a mussel. Hentet fra <https://www.kimberly-andrews.com/filter-feeding-in-a-mussel.html>
- Aryal, S. (2022). Biochemical Test and Identification of Staphylococcus epidermidis. Hentet fra <https://microbiologyinfo.com/biochemical-test-identification-staphylococcus-epidermidis/>
- Awan, F., Dong, Y., Wang, N., Liu, J., Ma, K. & Liu, Y. (2018). The fight for invincibility: Environmental stress response mechanisms and Aeromonas hydrophila. *Microb Pathog*, 116, 135-145. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.01.023>
- Baker-Austin, C., Oliver, J. D., Alam, M., Ali, A., Waldor, M. K., Qadri, F. & Martinez-Urtaza, J. (2018). Vibrio spp. infections. *Nat Rev Dis Primers*, 4(1), 8-19. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0005-8>
- Baker-Austin, C., Trinanes, J. A., Taylor, N. G. H., Hartnell, R., Siitonen, A. & Martinez-Urtaza, J. (2013). Emerging Vibrio risk at high latitudes in response to ocean warming. *Nature climate change*, 3(1), 73-77. <https://doi.org/10.1038/nclimate1628>
- Baralla, E., Demontis, M. P., Dessì, F. & Varoni, M. V. (2021). An overview of antibiotics as emerging contaminants: Occurrence in bivalves as biomonitoring organisms. *Animals (Basel)*, 11(11), 3239. <https://doi.org/10.3390/ani11113239>
- Belkin, S. & Colwell, R. R. (2005). *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. New York, NY: New York, NY: Springer New York.
- Beyer, J., Green, N. W., Brooks, S., Allan, I. J., Ruus, A., Gomes, T., ... Schøyen, M. (2017). Blue mussels (*Mytilus edulis* spp.) as sentinel organisms in coastal pollution monitoring: A review. *Mar Environ Res*, 130, 338-365. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.07.024>
- Blokesch, M. (2015). Protocols for Visualizing Horizontal Gene Transfer in Gram-Negative Bacteria Through Natural Competence. I(s. 189-204). Berlin, Heidelberg: Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Bøhle, B. (1979). *Dyrking av blåskjell i Norge : biologisk grunnlag, praktisk veiledning og muligheter* (bd. 1979:5). Bergen: Fiskeridirektoratets havforskningsinst.
- Campbell, V. M., Chouljenko, A. & Hall, S. G. (2022). Depuration of live oysters to reduce *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus*: A review of ecology and processing parameters. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 21(4), 3480-3506. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12969>
- Campos, C. J. A., Kershaw, S. R. & Lee, R. J. (2013). Environmental Influences on Faecal Indicator Organisms in Coastal Waters and Their Accumulation in Bivalve Shellfish. *Estuaries and coasts*, 36(4), 834-853. <https://doi.org/10.1007/s12237-013-9599-y>
- CLSI. (2020). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Hentet fra <https://www.nih.org.pk/wp-content/uploads/2021/02/CLSI-2020.pdf>
- Derome, N. (2019). Insights into Mussel Microbiome. I(s. 95-120). Switzerland: Switzerland: Springer International Publishing AG.
- Dore, W. J. & Lees, D. N. (1995). Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after deputation. *Applied and environmental microbiology*, 61(8), 2830-2834. <https://doi.org/10.1128/aem.61.8.2830-2834.1995>
- Doyle, M. P., Buchanan, R. L. & American Society for, M. (2013). *Food microbiology : fundamentals and frontiers* (4th ed. utg.). Washington, D.C: ASM Press.
- Duinker, A., Storesund, J. & Lunestad, B. T. (2022). *Nasjonalt tilsynsprogram for produksjon av skjell og andre bløtdyr - prøver analysert i 2020 for kjemiske forurensede stoffer og mikroorganismer*. Havforskningsinstituttet. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/nettrapporter/rapport-fra-havforskningen-2022-30#sec-2-1>
- Dyb, J. E. & Tuene, S. (2003). *Storfjordundersøkelsen Del 2 - Hydrografi i Storfjorden, historisk oversikt*. Møreforskning Ålesund.

- Edberg, S. C. & Kontnick, C. M. (1986). Comparison of beta-glucuronidase-based substrate systems for identification of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, 24(3), 368-371. <https://doi.org/10.1128/jcm.24.3.368-371.1986>
- EFSA. (2022). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA J*, 20(3), e07209-n/a. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209>
- El-Gamal, M. M. T. U. D. o. Z. (2011). The effect of depuration on heavy metals, petroleum hydrocarbons, and microbial contamination levels in *Paphia undulata* (Bivalvia: Veneridae). *Czech Journal of Animal Science*, 56(8), 345-354. <https://doi.org/10.17221/2395-cjas>
- EUCAST. (2023). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Hentet fra <http://www.eucast.org>
- FAO. (2010). Bivalve depuration: fundamental and practical aspects. *FAO aquaculture newsletter*, (46), 48.
- Fernández-Bravo, A. & Figueras, M. J. (2020). An update on the genus *Aeromonas*: Taxonomy, epidemiology, and pathogenicity. *Microorganisms*, 8(1), 129. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8010129>
- Folkehelseinstituttet. (2019a). ESBL holdige gramnegative stavbakterier Hentet fra <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/esbl-betalaktamaser-med-utvidet-spe/>
- Folkehelseinstituttet. (2019b). Skjellforgiftning - veileder for helsepersonell. Hentet fra <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/skjellforgiftning---veileder-for-he/>
- Folkehelseinstituttet. (2019c). Vibrio- og Shewanellainfeksjoner Hentet fra <https://www.fhi.no/nettpub/smittevernveilederen/sykdommer-a-a/vibrionaceaeinfeksjoner-diverse-art/>
- Folkehelseinstituttet. (2020). *Antibiotikaresistens - Kunnskapshull, utfordringer og aktuelle tiltak. Status 2020*. Hentet fra <https://www.fhi.no/globalassets/dokumenterfiler/rapporter/2020/amr-kunnskapshull-rapport.pdf>
- Folkehelseinstituttet. (2021). Antibiotikaresistens i Norge. Hentet fra <https://www.fhi.no/nettpub/hin/smitte/resistens/>
- Francino, M. P. (2012). *Horizontal gene transfer in microorganisms*. Norfolk, England: Caister Academic Press.
- Gosling, E. M. (2003). *Bivalve molluscs : biology, ecology and culture*. Oxford: Fishing News Books.
- Granum, P. E. (2015). *Matforgiftning : smitte gjennom mat og vann* (4. utg. utg.). Oslo: Cappelen Damm akademisk.
- Grevskott, D. H. (2020). *Bivalve mollusks as tools for monitoring antibiotic resistance in the marine environment* The University of Bergen.
- Grevskott, D. H., Ghavidel, F. Z., Svanevik, C. S. & Marathe, N. P. (2021). Resistance profiles and diversity of  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from city-scale sewage surveillance in Bergen, Norway mimic clinical prevalence. *Ecotoxicol Environ Saf*, 226, 112788-112788. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112788>
- Grevskott, D. H., Svanevik, C. S., Sunde, M., Wester, A. L. & Lunestad, B. T. (2017). Marine bivalve mollusks as possible indicators of multidrug-resistant *Escherichia coli* and other species of the enterobacteriaceae family. *Front Microbiol*, 8, 24-24. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00024>
- Grevskott, D. H., Svanevik, C. S., Wester, A. L. & Lunestad, B. T. (2016). The species accuracy of the Most Probable Number (MPN) European Union reference method for enumeration of *Escherichia coli* in marine bivalves. *J Microbiol Methods*, 131, 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.10.006>
- Hau, H. H. & Gralnick, J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu Rev Microbiol*, 61(1), 237-258. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.61.080706.093257>
- Havforskningsinstituttet. (2016). Blåskjell er ikke altetende. Hentet fra <https://forskning.no/havforskningsinstituttet-sjodyr-partner/blaskjell-er-ikke-altetende/387457>
- Havforskningsinstituttet. (2021). Tema: Blåskjell. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/temasider/arter/blaskjell>
- Hernandez, R., Acedo, I. & Dillon, J. G. (2020). Impact of wave action and rainfall on incidence and antibiotic resistance of total coliforms in Southern California beaches. *J Water Health*, 18(5), 766-775. <https://doi.org/10.2166/wh.2020.100>
- Hernroth, B. E., Conden-Hansson, A. C., Rehnstam-Holm, A. S., Girones, R. & Allard, A. K. (2002). Environmental Factors Influencing Human Viral Pathogens and Their Potential Indicator Organisms in the Blue Mussel, *Mytilus edulis*: the First Scandinavian Report. *Appl Environ Microbiol*, 68(9), 4523-4533. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.9.4523-4533.2002>

- Hong Nhung, P., Ohkusu, K., Mishima, N., Noda, M., Monir Shah, M., Sun, X., ... Ezaki, T. (2007). Phylogeny and species identification of the family Enterobacteriaceae based on dnaJ sequences. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58(2), 153-161. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.12.019>
- Huss, H. H. (1995). *Quality and quality changes in fresh fish* (bd. 348). Rome: FAO.
- Ikuta, K. S., Swetschinski, L., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2007). 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *J Clin Microbiol*, 45(9), 2761-2764. <https://doi.org/10.1128/JCM.01228-07>
- Janda, J. M. & Abbott, S. L. (2010). The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clin Microbiol Rev*, 23(1), 35-73. <https://doi.org/10.1128/CMR.00039-09>
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T. & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *J Appl Microbiol*, 123(3), 570-581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Jans, C., Sarno, E., Collineau, L., Meile, L., Stärk, K. D. C. & Stephan, R. (2018). Consumer exposure to antimicrobial resistant bacteria from food at Swiss retail level. *Front Microbiol*, 9, 362-362. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00362>
- Jay, J. M., Loessner, M. J. & Golden, D. A. (2021). Modern Food Microbiology. *Journal of Environmental Health*, 84(5), 38-38.
- Joseph, S. W., Colwell, R. R. & Kaper, J. B. (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic vibrios [Major cause of food poisoning]. *Crit Rev Microbiol*, 10(1), 77-124. <https://doi.org/10.3109/10408418209113506>
- Kausrud, K., Skjerdal, T., Johannessen, G. S., Ilag, H. K. & Norström, M. (2022). The Heat Is On: Modeling the Persistence of ESBL-Producing *E. coli* in Blue Mussels under Meal Preparation. *Foods*, 12(1), 14. <https://doi.org/10.3390/foods12010014>
- Kijewska, A., Koroza, A., Grudlewska-Buda, K., Kijewski, T., Wiktorczyk-Kapischke, N., Zorena, K. & Skowron, K. (2023). Molluscs—A ticking microbial bomb. *Frontiers in microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1061223>
- Kleinheinz, G. T., McDermott, C. M., Hughes, S. & Brown, A. (2009). Effects of Rainfall on *E. coli* Concentrations at Door County, Wisconsin Beaches. *Int J Microbiol*, 2009, 876050-876059. <https://doi.org/10.1155/2009/876050>
- Lees, D. (2000). Viruses and bivalve shellfish. *Int J Food Microbiol*, 59(1), 81-116. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00248-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00248-8)
- Lunestad, B. T., Frantzen, S., Svanevik, C. S., Roiha, I. S. & Duinker, A. (2016). Time trends in the prevalence of *Escherichia coli* and enterococci in bivalves harvested in Norway during 2007–2012. *Food control*, 60, 289-295. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.08.001>
- MacFadden, D. R., McGough, S. F., Fisman, D., Santillana, M. & Brownstein, J. S. (2018). Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nat Clim Chang*, 8(6), 510-514. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0161-6>
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., ... Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Manso, C. F. & Romalde, J. L. (2013). Detection and Characterization of Hepatitis A Virus and Norovirus in Mussels from Galicia (NW Spain). *Food Environ Virol*, 5(2), 110-118. <https://doi.org/10.1007/s12560-013-9108-2>
- Martinez-Albores, A., Lopez-Santamarina, A., Rodriguez, J. A., Ibarra, I. S., Del Carmen Mondragón, A., Miranda, J. M., ... Cepeda, A. (2020). Complementary methods to improve the depuration of Bivalves: A review. *Foods*, 9(2), 129. <https://doi.org/10.3390/foods9020129>
- Martínez, O., Rodríguez-Calleja, J. M., Santos, J. A., Otero, A. & García-López, M. L. (2009). Foodborne and Indicator Bacteria in Farmed Molluscan Shellfish before and after Depuration. *J Food Prot*, 72(7), 1443-1449. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-72.7.1443>
- Mathers, A. J., Peirano, G. & Pitout, J. D. D. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*, 28(3), 565-591. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-14>

- Mattilsynet. (2019a). Klassifisering av produksjonsområder for skjell. Hentet fra [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/produksjon\\_av\\_mat/fisk\\_og\\_sjomat/skjell\\_mat/klassifisering\\_av\\_produksjonsomraader\\_for\\_skjell.3960](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/produksjon_av_mat/fisk_og_sjomat/skjell_mat/klassifisering_av_produksjonsomraader_for_skjell.3960)
- Mattilsynet. (2019b). Kommersiell høsting og omsetning av levende skjell. Hentet fra [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/produksjon\\_av\\_mat/fisk\\_og\\_sjomat/skjell\\_mat/kommersieell\\_hosting\\_og\\_omsetning\\_av\\_levende\\_skjell.3961](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/produksjon_av_mat/fisk_og_sjomat/skjell_mat/kommersieell_hosting_og_omsetning_av_levende_skjell.3961)
- Mattilsynet. (u.å). Rutiner for trygg mat. Hentet fra [https://www.mattilsynet.no/mat\\_og\\_vann/rutiner\\_for\\_trygg\\_mat\\_en\\_innforing\\_i\\_internkontroll\\_og\\_haccp.12389/binary/Rutiner%20for%20trygg%20mat%20-%20En%20innf%C3%B8ring%20i%20internkontroll%20og%20HACCP](https://www.mattilsynet.no/mat_og_vann/rutiner_for_trygg_mat_en_innforing_i_internkontroll_og_haccp.12389/binary/Rutiner%20for%20trygg%20mat%20-%20En%20innf%C3%B8ring%20i%20internkontroll%20og%20HACCP)
- McGough, S. F., MacFadden, D. R., Hattab, M. W., Mølbak, K. & Santillana, M. (2020). Rates of increase of antibiotic resistance and ambient temperature in Europe: A cross-national analysis of 28 countries between 2000 and 2016. *Euro Surveill*, 25(45), 1-12. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.45.1900414>
- McLean, K., Rosenthal, C. A., Sengupta, D., Owens, J., Cookson, B. T., Hoffman, N. G. & Salipante, S. J. (2019). Improved species-level clinical identification of enterobacteriaceae through broad-range dnaJ PCR and sequencing. *J Clin Microbiol*, 57(11). <https://doi.org/10.1128/JCM.00986-19>
- Molina, F., López-Acedo, E., Tabla, R., Roa, I., Gómez, A. & Rebollo, J. E. (2015). Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnol*, 15(1), 48-48. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0168-2>
- Munn, C. B. (2005). *Pathogens in the Sea: An Overview*. I(s. 1-28). Boston, MA: Boston, MA: Springer US.
- Murros, K. E. (2022). Hydrogen Sulfide Produced by Gut Bacteria May Induce Parkinson's Disease. *Cells*, 11(6), 978. <https://doi.org/10.3390/cells11060978>
- Muyzer, G., De Waal, E. C. & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol*, 59(3), 695-700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>
- Nagelsen, V. & Fagerbakke, C. (2023). Fant resistens mot viktig antibiotika hos vanlig bakterie. Hentet fra <https://www.hi.no/hi/nyheter/2023/februar/fant-resistens-mot-viktig-antibiotika-hos-vanlig-bakterie>
- Naseer, U., Blystad, H., Angeloff, L., Nygård, K., Vold, L. & Macdonald, E. (2019). Cluster of septicemia and necrotizing fasciitis following exposure to high seawater temperatures in southeast Norway, June to August 2018. *International journal of infectious diseases*, 79, 28-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.083>
- Norgeskjell. (u.å-a). Dyrking. Hentet fra <https://www.norgeskjell.no/content/12/Dyrking>
- Norgeskjell. (u.å-b). Fabrikken. Hentet fra <https://www.norgeskjell.no/content/14/Fabrikken>
- Norgeskjell. (u.å-c). Om blåskjell. Hentet fra <https://www.norgeskjell.no/content/31/Om-Blaskjell>
- NORM/NORM-VET. (2021). Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway.
- Odeyemi, O. A., Burke, C. M., Bolch, C. C. J. & Stanley, R. (2019). Spoilage microbial community profiling by 16S rRNA amplicon sequencing of modified atmosphere packaged live mussels stored at 4°C. *Food research international*, 121, 568-576. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.017>
- Ottaviani, D., Santarelli, S., Bacchiocchi, S., Masini, L., Ghittino, C. & Bacchiocchi, I. (2006). Occurrence and characterization of *Aeromonas* spp. in mussels from the Adriatic Sea. *Food Microbiol*, 23(5), 418-422. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2005.08.001>
- Paterson, D. L. (2006). Resistance in Gram-Negative Bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Med*, 119(6), S20-S28. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.013>
- Percival, S. L. & Williams, D. W. (2014). Chapter Three - *Aeromonas*. I(Second Edition. utg., s. 49-64). Elsevier Ltd.
- Pharm, B. M. (2022). Trimethoprim-sulfamethoxazole: An overview. Hentet fra <https://www.uptodate.com/contents/trimethoprim-sulfamethoxazole-an-overview#H6246789>
- Rees, G. & World Health, O. (2010). *Safe management of shellfish and harvest waters*. London: published on behalf of the World Health Organization by IWA Pub.
- Regjeringen. (2015a). Nasjonal strategi mot Antibiotikaresistens. Hentet fra [https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi\\_antibiotikaresistens\\_230615.pdf](https://www.regjeringen.no/contentassets/5eaf66ac392143b3b2054aed90b85210/strategi_antibiotikaresistens_230615.pdf)
- Regjeringen. (2015b). Om oppdrettsnæringen. Hentet fra <https://www.regjeringen.no/no/dokumenter/meld.-st.-16-2014-2015/id2401865/?ch=6>
- Regjeringen. (u.å). *Opprydding i akvakulturnæringen med spesiell vekt på blåskjellanlegg*.

- Reilly, A. & Kaferstein, F. (1997). Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (HACCP) system for their control in aquaculture production. *Aquaculture research*, 28(10), 735-752. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1997.00939.x>
- Reygaert, W. C. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*, 4(3), 482-501. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2018.3.482>
- Richards, G. P. (1988). Microbial purification of shellfish: a review of depuration and relaying. *J Food Prot*, 51(3), 218-251. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-51.3.218>
- Rosa, M., Ward, J. E. & Shumway, S. E. (2018). Selective Capture and Ingestion of Particles by Suspension-Feeding Bivalve Molluscs: A Review. *Journal of shellfish research*, 37(4), 727-746. <https://doi.org/10.2983/035.037.0405>
- Rossolini, G. M., D'Andrea, M. M. & Mugnaioli, C. (2008). The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Infect*, 14(1), 33-41. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x>
- Rønneberg, J. E. (2007). *Status i blåskjellnæringen i Møre og Romsdal*.
- Salgueiro, V., Reis, L., Ferreira, E., Botelho, M. J., Manageiro, V. & Caniça, M. (2021). Assessing the bacterial community composition of bivalve mollusks collected in aquaculture farms and respective susceptibility to antibiotics. *Antibiotics (Basel)*, 10(9), 1135. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091135>
- Schiraldi, C. & Rosa, M. D. (2014). Mesophilic Organisms.
- Sperandio, V. & Hovde, C. J. (2015). *Enterohemorrhagic Escherichia coli and other shiga toxin-producing E. coli*. Washington, District of Columbia: ASM Press.
- Starliper, C. E. (2001). The Effect of Depuration on Transmission of *Aeromonas salmonicida* between the Freshwater Bivalve *Amblema plicata* and Arctic Char. *Journal of aquatic animal health*, 13(1), 56-62. [https://doi.org/10.1577/1548-8667\(2001\)013](https://doi.org/10.1577/1548-8667(2001)013)
- Statens, f. (2000). *Miljøgifter i norske fjorder : ambisjonsnivåer og strategi for arbeidet med forurenset sjøbunn = Contaminated sediments in Norwegian fjords : levels of ambition and strategy for further work*. Oslo: Statens forurensningstilsyn.
- Stratev, D. & Odeyemi, O. A. (2015). Antimicrobial resistance of *Aeromonas hydrophila* isolated from different food sources: A mini-review. *J Infect Public Health*, 9(5), 535-544. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2015.10.006>
- Sundsford, A., Simonsen, G. S., Haldvorsen, B., Lundblad, E. W. & Samuelsen, Ø. (2008). Bredspektrede betalaktamaser hos gramnegative stavbakterier. Hentet fra <https://tidsskriftet.no/2008/12/tema-antibiotika-og-resistens/bredspektrede-betalaktamaser-hos-gramnegative-stavbakterier>
- Tennant, A. D., Reid, J. E., Rockwell, L. J. & Bynoe, E. T. (1961). COLIFORM BACTERIA IN SEA WATER AND SHELLFISH: II. THE E. C. CONFIRMATION TEST FOR ESCHERICHIA COLI. *Revue canadienne de microbiologie*, 7(5), 733-739. <https://doi.org/10.1139/m61-087>
- Tryland, I. & Fiksdal, L. (1998). Enzyme characteristics of  $\beta$ -D-galactosidase- and  $\beta$ -D-glucuronidase- positive bacteria and their interference in rapid methods for detection of waterborne coliforms and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 64(3), 1018-1023. <https://doi.org/10.1128/aem.64.3.1018-1023.1998>
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P. W. & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *The Journal of eukaryotic microbiology*, 46(4), 327-338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Vezzulli, L., Brettar, I., Pezzati, E., Reid, P. C., Colwell, R. R., Höfle, M. G. & Pruzzo, C. (2012). Long-term effects of ocean warming on the prokaryotic community: evidence from the vibrios. *ISME J*, 6(1), 21-30. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.89>
- Vezzulli, L., Colwell, R. R. & Pruzzo, C. (2013). Ocean Warming and Spread of Pathogenic Vibrios in the Aquatic Environment. *Microb Ecol*, 65(4), 817-825. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0163-2>
- Vignaroli, C., Di Sante, L., Leoni, F., Chierichetti, S., Ottaviani, D., Citterio, B. & Biavasco, F. (2016). Multidrug-resistant and epidemic clones of *Escherichia coli* from natural beds of Venus clam. *Food Microbiol*, 59, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.003>
- WHO. (2014). *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. Geneva: World Health Organization.
- You, S., Huang, X., Xing, L., Lesperance, M., LeBlanc, C., Moccia, L. P., ... Zhang, X. (2023). Dynamics of fecal coliform bacteria along Canada's coast. *Mar Pollut Bull*, 189, 114712-114712. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.114712>
- Yu, K., Huang, Z., Xiao, Y. & Wang, D. (2022). *Shewanella* infection in humans: Epidemiology, clinical features and pathogenicity. *Virulence*, 13(1), 1515-1532. <https://doi.org/10.1080/21505594.2022.2117831>

Zannella, C., Mosca, F., Mariani, F., Franci, G., Folliero, V., Galdiero, M., ... Galdiero, M. (2017). Microbial diseases of bivalve mollusks: Infections, immunology and antimicrobial defense. *Mar Drugs*, 15(6), 182. <https://doi.org/10.3390/md15060182>



## Vedlegg A

## Resultater fra antimikrobiell resistens testing

Tabell 7: Resultater av minste inhiberende konsentrasjon (MIC) i blåskjell av forskjellige isolat av *Escherichia coli* på AMP (Ampicillin), MERO (Meropenem), CIP (Ciprofloxacin), AZI (Azithromycin), AMI (Amikacin), GEN (Gentamicin), TGC (Tigecycline), TAZ (Ceftazidime), FOT (Cefotaxime), CHL (Chloramphenicol), COL (Colistin), NAL (Nalidixic Acid), TET (Tetracycline), TMP (Trimethoprim) og SMX (Sulfamethoxazole) i oktober. Resistens mot antibiotika er markert med oransje.

Identitet	Oktober														
	MIC mg/L														
	A M P	M E R O	C I P	A Z I	A M I	G E N	T G C	T A Z	F O T	C H L	C O L	N A L	T E T	T M P	S M X
Stamme CCUG 17620	8	<0.03	<0.01 5	16	<4	<0. 5	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	0.5	>51 2
Indre dyrkingslokasjon, Før revanning															
IFO1	4	<0.03	0.03	<2	<4	1	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	<0.2 5	<8
Midtre dyrkingslokasjon, Før revanning															
MFO1	2	<0.03	0.03	16	<4	<0. 5	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	<0.2 5	>51 2
MFO2	< 1	16	2	<2	64	8	<0.2 5	>8	>4	<8	>16	>64	<2	<0.2 5	>51 2
MFO3	4	<0.03	<0.01 5	8	<4	<0. 5	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	0.5	>512
MFO4	4	<0.03	0.03	8	<4	1	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	0.5	>51 2
MFO5	4	<0.03	<0.01 5	8	<4	1	<0.2 5	0.5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	2	>51 2
MFO6	4	<0.03	0.03	16	<4	1	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	<0.2 5	>51 2
Midtre dyrkingslokasjon, Etter revanning															
MEO1	< 1	0.06	0.25	>64	<4	<0. 5	<0.2 5	8	0.5	<8	>16	64	<2	0.5	>51 2
Ytre dyrkingslokasjon, Før revanning															
YFO1	> 3 2	2	0.25	>64	<4	<0. 5	1	2	>4	32	<1	64	4	>16	512
YFO2	> 3 2	2	0.25	>64	<4	<0. 5	1	2	>4	32	<1	32	4	>16	512
YFO3	4	<0.03	0.03	8	<4	1	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	<0.2 5	>51 2
YFO4	8	<0.03	0.03	16	<4	1	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	<2	0.25	>51 2
YFO5	4	<0.03	0.03	8	<4	<0. 5	<0.2 5	<0.2 5	0.25	<8	<1	<4	<2	0.5	>51 2

YFO6	2	<0.03	0.03	8	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	0.5	>512
YFO7	4	<0.03	0.03	8	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	0.5	>512
YFO8	2	<0.03	0.03	8	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
YFO9	4	<0.03	0.03	8	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	0.5	>512
YFO10	2	<0.03	0.03	8	<4	1	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	0.5	>512
YFO11	4	<0.03	0.03	8	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
YFO12	4	<0.03	0.03	8	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
YFO13	4	<0.03	0.03	8	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
YFO14	4	<0.03	<0.015	8	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
Ytre dyrkingslokasjon, Etter revanning															
YEO1	2	<0.03	<0.015	4	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	<8

Tabell 8: Resultater av minste inhiberende konsentrasjon (MIC) i blåskjell av forskjellige isolat av Escherichia coli på AMP (Ampicillin), MERO (Meropenem), CIP (Ciprofloxacin), AZI (Azithromycin), AMI (Amikacin), GEN (Gentamicin), TGC (Tigecycline), TAZ (Ceftazidime), FOT (Cefotaxime), CHL (Chloramphenicol), COL (Colistin), NAL (Nalidixic Acid), TET (Tetracycline), TMP (Trimethoprim) og SMX (Sulfamethoxazole) i mars. Resistens mot antibiotika er markert med oransje.

Mars															
MIC mg/L															
Identitet	AMP	MERO	CIP	AZI	AMI	GEN	TGC	TAZ	FOT	CHL	COL	NAL	TET	TMP	SMX
Stamme CCUG 17620	4	0.25	<0.015	16	<4	<0.5	<0.25	0.5	<0.25	<8	<1	<4	<2	0.5	>512
Indre dyrkingslokasjon, Før revanning															
IFM1	8	0.06	0.03	8	<4	<0.5	<0.25	0.5	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
IFM2	4	0.06	0.03	8	<4	1	<0.25	0.5	0.5	16	<1	<4	<2	1	>512
IFM3	4	0.06	0.03	16	<4	<0.5	<0.25	0.5	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
IFM4	4	0.06	0.03	8	<4	1	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
IFM5	16	4	0.12	<2	<4	<0.5	<0.25	>8	>4	<8	>16	<4	<2	>16	16
Midtre dyrkingslokasjon, Før revanning															
MFM1	2	<0.03	>0.015	4	<4	<0.5	<0.25	<0.25	<0.25	<8	<1	<4	<2	<0.25	>512
MFM2	32	8	0.5	4	<4	2	<0.25	1	4	<8	2	<4	4	2	>512

MFM3	2	<0.03	<0.01 5	4	<4	<0. 5	<0.2 5	<0.2 5	<0.2 5	<8	<1	<4	4	<0.2 5	>51 2
MFM4	1 6	2	0.25	8	<4	1	<0.2 5	1	2	<8	<1	<4	4	0.5	>51 2
MFM5	2	0.06	0.06	4	<4	2	<0.2 5	0.5	0.5	<8	<1	<4	<2	<0.2 5	>51 2
Ytre dyrkingslokasjon, Før revanning															
YFM1	> 3 2	>16	1	4	<4	2	0.5	2	>4	<8	16	<4	8	>16	>51 2

