



Antimikrobiell resistens i terrestrisk miljø



ANTIMIKROBIELL RESISTENS I TERRESTRISK MILJØ

Forfattere

Nesse, Live L. (VI), Forfang, Kristin (NIBIO), Stenrød, Marianne (NIBIO), Slette-meås, Jannice Schau (VI), Tessema, Girum Tadesse (VI), Hagen, Snorre (NIBIO), Norström, Madelaine (VI), Elameen, Abdelhameed (NIBIO), Johannessen, Gro (VI), Sunde, Marianne (VI), Almvik, Marit (NIBIO), Eiken, Hans Geir (NIBIO)

Forslag til sitering

Nesse, L.L., Forfang, K., Stenrød, M., Slette-meås, J.S., Tessema, G.T., Hagen, S., Norström, M., Elameen, A., Johannessen, G., Sunde, M., Almvik, M., Eiken, H.G., Antimikrobiell resistens i terrestrisk miljø. VI rapport. Veterinærinstituttet 2021. © Veterinærinstituttet, kopiering tillatt når kilde gjengis

Kvalitetssikret av

Merete Hofshagen, avdelingsdirektør dyrehelse, dyrevelferd og mattrygghet, Veterinærinstituttet

Publisert

2021 på www.vetinst.no
ISSN 1890-3290 (elektronisk utgave)
© Veterinærinstituttet 2021

Oppdragsgiver



Miljø-
direktoratet

Kolofon

Design omslag: Reine Linjer

Foto forside: Lab-bildet, Eivind Røhne. Landskapsbildet, Hans Geir Eiken. Chip bildet, NIBIO

www.vetinst.no

Innhold

1	Bakgrunn	5
2	Materiale og metoder	6
2.1	Studiedesign	6
2.2	Bearbeiding av prøver	7
2.3	Undersøkelse av resistens hos <i>E. coli</i> og <i>Hafnia</i> spp.....	8
2.4	Undersøkelse av resistensgener i prøvematerialet	9
2.5	Måling av antibiotika, pesticider og tungmetaller i jord.....	11
2.6	Databearbeiding og statistiske analyser	12
3	Resultater	14
3.1	Prøver	14
3.2	Funn av bakterier	15
3.3	Resistens hos isolerte bakterier.....	17
3.4	Resistensgener i prøvematerialet.....	19
3.5	Forekomst av antibiotika og tungmetaller i jord.....	26
3.6	Forekomst av pesticider i jord	26
4	Diskusjon	30
4.1	Forekomst av resistens	30
4.2	Potensielle drivere (pesticider, tungmetaller, antibiotika)	31
4.3	Videre studier og overvåkning	32
5	Konklusjon	34
6	Takk	35
6.1	Veterinærinstituttet	35
6.2	NIBIO	35
7	Referanser	36
8	Appendiks	38

Sammendrag

Denne studien ble utført på oppdrag fra Miljødirektoratet for å kartlegge antibiotikaresistens i terrestriske miljø basert på ulik eksponering av resistensdrivere. Hensikten var å få en mer helhetlig forståelse av miljøets rolle i utvikling og spredning av antibiotikaresistens. Totalt 644 prøver fra jord, rødkløver, snegler, mus/spissmus og meitemark ble samlet inn fra ulike miljøer i løpet av 2019-20 og analysert for forekomst av antibiotikaresistens, samt potensielle drivere som antibiotika, pesticider og tungmetaller i jord.

Det ble funnet antibiotikaresistente *E. coli* i 7,2 prosent av prøvene som inneholdt *E. coli*. Dette er på omtrent samme nivå som i tidligere undersøkelser av norsk rødrev og hjortevilt. De antibakterielle midlene som bakteriene var resistente mot tilsvarer funn fra tidligere studier på villfauna, produksjonsdyr og bladgrønnsaker i norske studier og overvåkningsprogrammer. Disse funnene understreker hvor viktig det er å se antibiotikaresistens i et «En Helse»-perspektiv hvor også miljø er med.

Antibiotikaresistensgener (ARG) ble funnet i 60 prosent av prøvene ved hjelp av en nyutviklet DNA chip. For de prøvene hvor man også fant resistente *E. coli*, stemte resultatene fra de to metodene godt overens. Det kan tyde på at også en del av prøvene hvor *E. coli* ikke ble funnet, inneholdt resistente bakterier. Resultatene sier ikke hvilke bakterier som eventuelt inneholdt resistensgener, og hvilken betydning de har. Resultatene viser imidlertid at bruk av denne DNA chipen kombinert med isolering og karakterisering av bakterier kan være en relevant metode for undersøkelse av fremtidige miljøprøver.

Prøver tatt ut om høsten hadde mer ARG enn prøver tatt ut om våren. Ingen resistente *E. coli* ble funnet på steder med lite menneskelige aktivitet, og det var også lavere forekomst av ARG i prøver fra slike steder enn fra landbruksområder. Alle resistente *E. coli* unntatt en kom fra økologisk landbruk, og miljøer hvor det ble brukt husdyrgjødsel hadde høyere forekomst av resistens enn annen drift. Økologisk landbruk hadde også flere prøver hvor det ble funnet *E. coli* generelt. I hvilken grad dette har påvirket forekomsten av resistens er ukjent.

Såkalte drivere er faktorer som kan stimulere til utvikling og spredning av antibiotikaresistens. Antibiotikabruk er en kjent driver, og tungmetaller og pesticider er foreslåtte drivere. I dette prosjektet ble forekomst av alle disse tre driverne målt i jordprøver, og sammenholdt med forekomst av antibiotikaresistens på samme sted. Ingen av prøvene inneholdt antibiotika. Det ble ikke funnet noen sammenheng mellom pesticider og antibiotikaresistens. Konsentrasjonene av tungmetaller i jorden på de ulike stedene var for like til å kunne forklare noen resistensforskjeller i dette materialet.

SUMMARY

This study was commissioned by the Norwegian Environment Agency to map antibiotic resistance in terrestrial environments based on different exposures of resistance drivers. The purpose was to gain a more comprehensive understanding of the role of the environment in the development and spread of antibiotic resistance. A total of 644 samples from soil, red clover, snails/slugs, mice/shrews and earthworms were collected from different environments during 2019-20 and analyzed for the presence of antibiotic resistance, as well as potential drivers such as antibiotics, pesticides and heavy metals in soil.

Antibiotic-resistant *E. coli* were identified in 7.2% of the samples containing *E. coli*. This is approximately the same level as reported in previous studies on Norwegian red foxes and deer. Resistance profiles were similar to findings from previous studies on wild fauna, production animals and leafy vegetables in Norwegian studies and monitoring programs. These findings underline the importance of addressing antibiotic resistance in a One Health perspective that also includes the environment.

Antibiotic resistance genes were found in 60% of the samples by the use of a newly developed DNA chip. For the samples where resistant *E. coli* had been identified, the results from the two methods agreed well. This may indicate that other resistant bacteria were present in some of the samples where *E. coli* could not be isolated. However, the results do not provide information on which bacteria and the significance of these. The results show that using this DNA chip together with isolation and characterization of bacteria, can be a good and relevant method for examining future environmental samples for antibiotic resistance.

Samples collected in the autumn displayed more resistance than samples taken in the spring. Less antibiotic resistance was identified in places with little human activity as compared to agricultural areas. Organic farming and the use of livestock manure were correlated with a higher prevalence of resistance than other farming practices. *E. coli* in general was also found in more samples from organic farming. The extent to which this might have affected the occurrence of resistance is unknown.

So-called drivers are factors that can stimulate the development and spread of antibiotic resistance. Antibiotics are a well-known driver, and heavy metals and pesticides are suggested drivers. In this project, the concentration of all three groups of drivers was measured in soil samples, and compared with the prevalence of antibiotic resistance at the same sites. None of the samples contained antibiotics. No association was found between pesticides and antibiotic resistance genes. The concentrations of heavy metals in the soil at the different locations were too similar to explain any resistance differences in this material.

1 Bakgrunn

Utvikling og spredning av antimikrobiell resistens er et raskt voksende globalt problem og utgjør en av de største helsetrusler vi står overfor i dag. Regjeringens nasjonale strategi mot antibiotikaresistens for 2015-2021 [1] peker på den sterke sammenhengen mellom human-, dyre- og fiskehelse, samt miljø. Dette gjør det nødvendig å møte denne utfordringen med en samlet innsats på tvers av fagområder, også omtalt som en Én helse (One Health) strategi. Det presiseres at det er viktig å kartlegge tilstedeværelsen av resistens i bakteriesamfunn i jord, ferskvann, sjø, sedimenter, viltlevende dyr og husdyr for å forstå hvordan naturmiljøer kan bidra til å spre resistens.

I tillegg til å kunne bidra til spredning av resistens oppstått ved antibiotikabehandling av mennesker, dyr og fisk, kan resistens også oppstå i miljøet [2]. Bruk av antibiotika er en viktig driver for utvikling av resistente bakterier, og ulike pesticider og tungmetaller er også foreslått å kunne fungere som drivere ([VKM 2016](#), [VKM 2017](#)) [3,4]. Undersøkelser av 30.000 år gamle sedimenter har funnet naturlig forekommende resistensgener mot en rekke antibiotika som brukes i dag. Dette viser at utvikling av antimikrobiell resistens har vært et naturlig fenomen som har forekommet lenge før mennesker begynte å bruke antibiotika [5].

Arbeidet som presenteres i denne rapporten er utført på oppdrag fra Miljødirektoratet. Hensikten med oppdraget var: Kartlegging av antibiotikaresistens i terrestriske miljøer, herunder jord, basert på ulik eksponering av resistensdrivere for å få en mer helhetlig forståelse av miljøets rolle i utvikling og spredning av antibiotikaresistens.

Oppdraget ble utført av Veterinærinstituttet og NIBIO. Prøver av jord, planter og terrestriske dyr ble samlet inn fra fire områder i Norge 2019 og ti områder 2020 som inkludert de fire områdene fra foregående år. Prøvene ble undersøkt for forekomst av antibiotikaresistente bakterier og resistensgener. I tillegg ble jordprøvene undersøkt for innhold av potensielle resistensdrivere som antibiotika, tungmetaller, pesticider og andre biocider.

2 Materiale og metoder

2.1 Studiedesign

Prøver ble samlet inn fra fire geografiske områder i fire ulike fylker vår og høst 2019, og fra ti områder i åtte ulike fylker våren 2020 (Appendiks Tabell A 1).

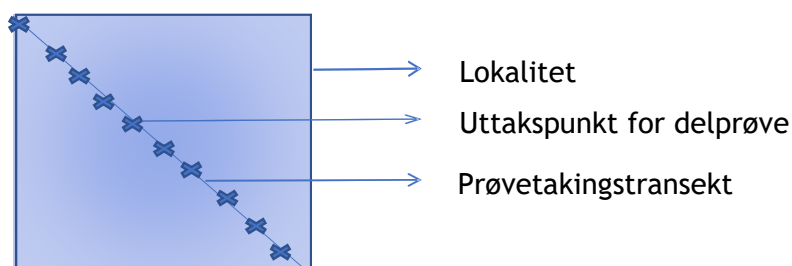
Innsamlingsmånedene var juni (vår) og september (høst). Innsamling ble forsøkt lagt til når områder var snøfrie og når plantevekst var i gang om våren, og når plantevekst avtok om høsten før det ble snø igjen. Konkret dato for innsamling i juni og september ble forsøkt justert etter de geografiske områdene, med senere datoer om våren og tidligere datoer om høsten jo lenger nord i Norge området var plassert.

Fra hvert av områdene ble prøver tatt fra tre ulike typer lokaliteter:

- «Økologisk», dvs. randsonen av økologisk jordbruk
- «Konvensjonell», dvs. randsonen av konvensjonelt jordbruk
- «Øde», dvs. et sted i samme område med lite menneskelig aktivitet og i hovedsak naturlig vegetasjon

Prøveplanene tok sikte på innsamling av totalt 764 prøver (Appendiks Tabell A 1). I 2019 ble prøver samlet inn både høst og vår i fire områder (A, B, D, H). I hvert av de fire områdene ble det tatt én jordprøve (samleprøve) per lokalitet (økologisk, konvensjonell og øde), og inntil ti individprøver av rødkløver, snegl, mus og meitemark (meitemark bare om våren) fra randsonene til landbruksfeltene. I 2020 ble det kun samlet inn prøver på våren i ti ulike områder (A-J). I hvert av de ti områdene ble det tatt jordprøver (samleprøver) fra fire ulike øde lokaliteter, og én jordprøve fra hver av de to typene landbruk (økologisk og konvensjonelt). I tillegg ble det tatt inntil fem individprøver av rødkløver og snegl fra randsonene til landbruksfeltene.

Jordprøvene ble tatt fra de øvre 0-5 cm ved hjelp av et jordbor med diameter på ca. 5 cm. Ti delprøver fra hver lokalitet, fordelt jevnt over et transekt diagonalt over feltet (Figur 1), ble blandet til én samleprøve før innsending til laboratoriet.



Figur 1: Plan for prøvetaking fra jord

Mus ble fanget i musefeller som ble satt ut dagen før to påfølgende dager med innsamling. De andre artene (snegl, meitemark og rødkløver) ble samlet på innsamlingsdagen. Alle prøvene ble samlet inn med bruk av plasthansker og lagt i separate plastposer med ett individ pr pose.

Prøver ble sendt med post nedkjølt til laboratoriet og oppbevart ved 4 °C til de ble videre behandlet.



Figur 2: En klatremus i en felle i område B (venstre) og en orangeskogsnegl i område C (høyre). Foto: H.G. Eiken

Forekomst av antibiotikaresistens i prøvene ble kartlagt ved å se etter både resistente bakterier og antibiotikaresistensgener (ARG) og *E. coli* og *Hafnia* spp. ble valgt som indikatorbakterier på forurensing av tarmbakterier fra mennesker, dyr, fugler eller insekter.

Forekomst av potensielle resistensdrivere som antibiotika, pesticider og tungmetaller ble undersøkt i jordprøvene.

2.2 Bearbeiding av prøver

Fra mus ble det tatt ut magetarmkanal med innhold. Snegler og meitemark ble avkjølt til 4 °C og avlivet ved å delt i to eller flere deler, avhengig av størrelsen. Dette bidro til at også tarminnhold ble tilgjengelig for undersøkelse. Alle delene fra et individ ble undersøkt samlet. Rødkløverplantene ble brukt hele, og av jordprøvene ble det brukt 25 g. Alle prøver ble tilsatt sterilt bufret peptonvann (BPV) i forholdet 1:10 vekt/volum og blandet godt i 30 s i stomachermaskin eller manuelt. Deretter ble de inkubert ved 37 °C i 24 timer. Neste dag ble det fra hver prøve frosset ned oppformeringsmedium til senere undersøkelse av resistensgener, og oppformeringsmedium tilsatt glyserol til en sluttkonsentrasjon på 15 % for eventuell senere oppdyrking av bakterier. Nedfrosset materiale ble oppbevart på -70 °C.

I 2019 ble det i tillegg sådd ut 10 µL av oppformeringsmediet på MacConkey agar skåler som ble inkubert ved 37 °C i 24 timer. MacConkey er en selektiv agar for Gram negative bakterier som brukes for isolering av *Enterobacteriaceae* og *Pseudomonas* spp. Etter inkubering ble skåler fra alle prøvene undersøkt for forekomst at *E. coli*, og der *E. coli* ble funnet, ble det plukket ut kolonier fra hver prøve som ble rendyrket og identiteten bekreftet ved hjelp av MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption Time of Flight Mass Spectrometry). I alle vårprøvene ble det også lett etter *Hafnia* spp., mens det i høst-prøvene bare ble lett etter

Hafnia spp. i prøver hvor det ikke hadde blitt funnet *E. coli*. Fra prøver med *Hafnia* spp. ble det også plukket ut kolonier for rendyrking og identifisering. Bekreftede kolonier ble frosset ned ved -70 °C i frysemedium med glyserol. Hvis antallet kolonier per art var høyere enn tre, ble det frosset ned tre av dem.

2.3 Undersøkelse av resistens hos *E. coli* og *Hafnia* spp.

2.3.1 Fenotypiske undersøkelser

Fenotypisk resistens hos alle *E. coli* og *Hafnia* spp. ble undersøkt ved hjelp av en kvalitetskontrollert mikrobuljongfortynningsmetode med de samme EUVSEC panelene fra Sensititre® TREK som brukes i det pågående nasjonale overvåkningsprogrammet for antibiotikaresistens i mikrober fra fôr, dyr og næringsmidler [NORM-VET 2019](#). De antimikrobielle substansene som er inkludert i panelet er vist i Tabell 1. I tillegg ble alle *E. coli*-isolater fra prøver positive for streptomycin resistensgener, undersøkt for fenotypisk uttrykt streptomycin resistens ved hjelp av gradientstrips på agarskåler (E-TEST® bioMérieux). Epidemiologiske cut-off verdier (ECOFFs) fra European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ble brukt for kategorisering av følsomhet hos *E. coli*. Kontrollstammer ved mikrobuljongfortynningsmetoden var *E. coli* ATCC 25922, *Hafnia* spp. CCUG41547 og *Hafnia* spp. CCUG59411, og ved streptomycin-testen *E. coli* 2003-10-681 og *E. coli* 2002-10-702.

Tabell 1: Antimikrobielle substanser som har inngått i fenotypetestingen med EUVSEC panelene

Stoffgruppe	Stoff
Tetracykliner	Tetracyklin Tigecyklin
Amfenikoler	Kloramfenikol
Penicilliner med ekstandert spektrum betalaktamaser	Ampicillin
Cefalosporiner	Ceftazidim Cefotaxim
Karbapenemer	Meropenem
Trimetoprim og derivater	Trimetoprim
Sulfonamider	Sulfamethoxazol
Makrolides	Azithromycin
Andre aminoglykosider	Gentamicin
Fluorokinoloner	Ciprofloxacin
Andre kinoloner	Nalidiksinsyre
Polymyxiner	Colistin

2.3.2 Genotypiske undersøkelser av resistente bakterieisolater

Et utvalg av fenotypisk resistente bakterier ble helgenomsekvensert på følgende måte: Bakterielt DNA ble ekstrahert ved hjelp av QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN). Isolert DNA ble kvantifisert og kvalitetskontrollert på Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific) og NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific). Mellom 100-500 ng DNA ble enzymatisk fragmentert og merket ved hjelp av Illumina DNA library prep og IDT® for Illumina® DNA/RNA UD Indexes. Hvert bibliotek ble analysert på en TapeStation 4200 (Agilent Technologies) før pooling, og deretter kvantifisert ved hjelp av Qubit™ 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Gjennomsnittlig fragmentstørrelse ble bestemt ved bruk av TapeStation 4200 (Agilent Technologies). Sekvensering ble gjennomført ved bruk av MiSeq plattform (Illumina) og MiSeq Reagent Kit v3 600 cycles (2 x 300 bp) (Illumina). Etter sekvensering ble read-lengdene demultiplekset ved hjelp av bcl2fastq v2.19.0.316 (Illumina) og read-kvaliteten ble bekreftet med FastQC v0.11.8 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>).

For *E. coli* isolatene ble helgenomdata assemblert ved bruk av Bifrost pipeline (<https://doi.org/10.5281/zenodo.3841963>). Pipelinen bruker FastQC v0.11.9 (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) og MultiQC v1.9 [6] for å kvalitetskontrollere reads før PhiX fjernes ved hjelp av bbduk (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>). Genomene ble assemblert ved å bruke Trimmomatic v0.39 [7] etterfulgt av assembly med SPAdes v3.14.0 [8]. SPAdes assemblene ble kjørt gjennom Pilon v1.23 [9] for polishing og kvaliteten ble evaluert ved bruk av QUAST v5.0.2 [10] før de ble annotert i prokka v1.14.5 [11]. Pipeline ble også benyttet for å detektere MLST profil ved bruk av Antimicrobial resistance gene identification by assembly (ARIBA) v2.14.6 [12] med MLST skjema fra Enterobase [13].

Assemblene ble videre brukt som input for artsidentifisering ved bruk av KmerFinder v3.2 [14-16] og karakterisering av antibiotikaresistensgener ved bruk av ResFinder v4.1 [17,18] fra Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>).

2.4 Undersøkelse av resistensgener i prøvematerialet

Totalt ble det mottatt 644 prøver i form av overnattskulturer i BPV-medium. DNA ble isolert fra prøvene ved bruk av DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen) med optimalisert protokoll for gram-negative bakterier. For jordprøvene fra 2020 ble DNA isolert ved bruk av DNeasy Power Soil kit (Qiagen) ved å følge produsentens anbefalinger. Prøvene ble pre-amplifisert/oppkonsentrert ved vanlig PCR (Thermo Fisher Scientific) før kjøring på DNA-chip, hvor det kun benyttes 6,7 nL i reaksjonskammeret. Analysene foregikk ved bruk av Real-time PCR på et Biomark HD instrument (Fluidigm) der en 96.96 IFC-chip (Fluidigm) ble benyttet. Totalt inngikk 46 kvantitative PCR-tester i DNA-chipen som kan detektere 34 ulike antibiotikaresistensgener (ARG), som kan gi opphav til resistensutvikling mot de vanligste gruppene av antibiotika som brukes i dag (Tabell 2), samt tilstedeværelse av mikrobielt DNA (16S) og integrase genet hos klasse 1 integroner, *intl1*. Alle prøvene ble analysert i to replikatreksjoner og det ble inkludert 11 positive og 4 negative kontroller som en del av kvalitetssikringen av analysen.

Kvantifisering av resultatene ble basert på standardkurver for hver enkelt gentest, med korrigering av C_T («threshold cycle») ved bruk av positive kontroller. Påvisning av mikrobielt DNA (16S) oppgis i ng/ μ L, mens påviste ARG er oppgitt som relativ konsentrasjon av ARG i forhold til 16S (ARG/16S).

DNA-eluatere fra isolerte bakterier med påvist fenotypisk resistens ble også analysert ved kjøring på DNA-chip i tillegg til helgenomsekvenseringen.

Tabell 2: Oversikt over antibiotikaresistensgener (ARG) inkludert i DNA-chip, med ansvarlig mekanisme og gruppe antibiotika genet gir opphav til resistens mot. Mer informasjon kan fås ved henvendelse til forfatterne av rapporten.

ARG	Mekanisme	Gruppe antibiotika	Eksempel antibiotika
<i>aac6</i>	Kjemisk modifikasjon av antibiotikum (acetylering)	Aminoglykosider, fluorokinoloner	*mycin, *micin, *xacin
<i>aac3</i>	Kjemisk modifikasjon av antibiotikum (acetylering)	Aminoglykosider	*mycin, *micin
<i>ant3</i>	Kjemisk modifikasjon av antibiotikum (adenylering)	Aminoglykosider	*mycin, *micin
<i>aph3</i>	Kjemisk modifikasjon av antibiotikum (fosforylering)	Aminoglykosider	*mycin, *micin
<i>blaACT</i>	Ødeleggelse av antibiotikum (hydrolyse)	Penicilliner, cefalosporiner, c karbapenemer	*cillin, *penem, cef**
<i>blaCTX</i>	Ødeleggelse av antibiotikum (hydrolyse)	Cefalosporiner	cef**
<i>blaDHA</i>	Ødeleggelse av antibiotikum (hydrolyse)	Cefalosporiner	cef**
<i>blaKPC</i>	Ødeleggelse av antibiotikum (hydrolyse)	Karbapenemer, cefalosporiner, monobactamer	*penem, *monam, cef**
<i>blaNDM</i>	Ødeleggelse av antibiotikum (hydrolyse)	Karbapenemer, cefalosporiner	*penem, cef**
<i>blaSHV</i>	Ødeleggelse av antibiotikum (hydrolyse)	Karbapenemer, cefalosporiner	*penem, cef**
<i>blaTEM</i>	Ødeleggelse av antibiotikum (hydrolyse)	Penemer, monobactamer, cephalosporiner	*penem, *monam, cef**
<i>blaVIM</i>	Ødeleggelse av antibiotikum (hydrolyse)	Karbapenemer, cefalosporiner	*penem, cef**
<i>catA</i>	Kjemisk modifikasjon av antibiotikum (acetylering)	Amfenikoler	*amphenicol
<i>cmlA</i>	Efflukspumpe (amfenikoler)	Amfenikoler	*amphenicol
<i>dfrA</i>	Alternativt protein (sensitiv/resistent)	DHFR inhibitorer	*prim, *pyrimidine
<i>ermB</i>	Enzymatisk endring av bindingssete	Makrolider, streptograminer, linkosamider	*mycin
<i>ermF</i>	Enzymatisk endring av bindingssete	Makrolider, streptograminer, linkosamider	*mycin
<i>floR</i>	Efflukspumpe (amfenikoler)	Amfenikoler	*phenicol
<i>mcr1</i>	Enzymatisk endring av bindingssete	Andre	colistin
<i>mecA</i>	Alternativt protein (sensitiv/resistent)	Penamer, penicilliner	penam, methicillin
<i>oqxA</i>	Efflukspumpe (fluorokinolon)	Fluorokinoloner, DHFR inhibitorer, glysylykliner, nitrofurane, tetrasykliner	*xacin, *pyrimidine, *cycline
<i>oqxB</i>	Efflukspumpe (fluorokinolon)	Fluorokinoloner, DHFR inhibitorer, glysylykliner, nitrofurane, tetrasykliner	*xacin, *pyrimidine, *cycline
<i>qnrA1</i>	Beskyttelse av bindingssete	Fluorokinoloner	*xacin, nalidixinsyre
<i>qnrB1</i>	Beskyttelse av bindingssete	Fluorokinoloner	*xacin, nalidixinsyre
<i>qnrS</i>	Beskyttelse av bindingssete	Fluorokinoloner	*xacin, nalidixic acid

<i>strA</i>	Kjemisk modifikasjon av antibiotikum (fosforylering)	Aminoglykosider	*mycin, *micin
<i>strB</i>	Kjemisk modifikasjon av antibiotikum (fosforylering)	Aminoglykosider	*mycin, *micin
<i>sul1</i>	Beskyttelse av bindingssete	Sulfonamider	sulfa**
<i>sul2</i>	Beskyttelse av bindingssete	Sulfonamider	sulfa**
<i>sul3</i>	Beskyttelse av bindingssete	Sulfonamider	sulfa**
<i>tetA</i>	Efflukspumpe (tetrasyklin)	Tetrasykliner	*cycline
<i>tetB</i>	Efflukspumpe (tetrasyklin)	Tetrasykliner	*cycline
<i>tetM</i>	Beskyttelse av bindingssete	Tetrasykliner	*cycline
<i>vanA</i>	Bypass av bindingssete	Glykopeptider	vancomycin, teicoplanin

2.5 Måling av antibiotika, pesticider og tungmetaller i jord

De fire lokalitetene i 2019 og de ti lokalitetene i 2020 hvor det ble tatt ut jordprøver, ble valgt basert på tilgjengelig informasjon om langsiktig praksis med bruk av pesticider og husdyrgjødsel. Alle de totalt 84 jordprøvene ble analysert for pesticider, prøvene fra 2019 (24) ble analysert for rester av antibiotika/antimikrobielle stoffer og prøvene fra høst 2019 (12) ble undersøkt for rester av tungmetaller gjennom en grunnstoffanalyse. Flest jordkjemiske analyser ble gjort med tanke på å påvise rester av pesticider, da dette var forventet å være den viktigste kjemiske påvirkningsfaktoren som kunne benyttes til å skille de ulike prøvetakingslokalitetene. Bruken av antibiotika i norsk husdyrproduksjon er lav, og den resulterende tilførselen av rester av antibiotika til jord antas å være lav. Variasjonen i innhold av tungmetaller var forventet å være lav mellom de ulike lokalitetene.

Samleprøver av jord fra toppsjiktet (0-5 cm jorddybde) tatt ut som beskrevet i 3.2, ble i hovedsak frosset kort tid etter prøveuttak og sendt med ekspressfrakt til laboratoriet hvor de ble lagret ved -20 °C fram til analyse. Forsinkelser i posten førte til at tre prøver fra Nordland i 2019 ble liggende ved romtemperatur mer enn en uke ved ankomst. Dette ble ikke ansett å være av vesentlig betydning. Vanninnholdet ble bestemt i alle jordprøver etter tørking av en delprøve over natt ved 105 °C.

For analyse av rester av pesticider og antibiotika ble 10 gram ferske jordprøver ekstrahert med acetonitril. Ekstraktene ble analysert for innhold av pesticider med NIBIOS screeningmetode «M119» på LC-HRMS (Thermo LC-QExactive Orbitrap), som omfatter søk etter 800 pesticider og metabolitter, sammen med en komplementær screeningdatabase med 100 antimikrobielle stoffer. Ugrasmidler i gruppen «sure herbicider» (syrer), samt glyfosat, krever tilpassede ekstraksjons- og analysemetoder og er ikke inkludert i screeningmetoden. Prøvene ble analysert i Full MS-data independent acquisition (FMS-DIA) for å få en foreløpig identifikasjon av stoffer påvist i jordprøvene. Disse forbindelsene ble verifisert ved bruk av Full MS-dataavhengig massespektrometri (FMS-ddMS2) i positiv elektropray-modus. Analysen av alle ioniserte forbindelser og fragmenter tok 18 minutter per prøve. Forbindelser er identifisert basert på nøyaktig masse av analytten (innen +/- 5 ppm av forventet eksakt masse), retensjonstid, fragmentmasse (+/- 5 ppm) og match i MS2 spektralbibliotek. Forbindelser ble kvantifisert ved å benytte standardløsninger i området 0,9-120 ng/mL løst i acetonitril. Pyraclostrobin-d3 ble brukt som intern standard for å justere for gjenfinning og mulige matriks-effekter, og ble tilsatt til alle prøver og standarder til en konsentrasjon på 40 ng/mL.

Før analyse av tungmetaller og andre grunnstoffer ble jordprøven tørket, siktet (2 mm) og mortret. 0,2 g mortret jordprøve ble dekomponert med 4 mL salpetersyre 65 % i en Ultrawave (avansert mikrobølgeovn), fortynnet med 20 mL ionebyttet vann og analysert med inductively coupled plasma - optical emission spectrometry (ICP-OES) for bestemmelse av mengde grunnstoffer.

2.6 Databearbeiding og statistiske analyser

2.6.1 Isolerte bakterier

Alle prøver og isolater ble registrert i Veterinærinstituttets prøve- og journalsystem. Resultater fra resistenstesting ble lagret som diskrete MIC-verdier (MIC = minimum inhibitory concentration) for hvert isolat. Databearbeiding ble foretatt i SAS-PC System® v 9.4 for Windows (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) og i R versjon 3.6.2 (The R Foundation for Statistical Computing Platform). Statistiske analyser ble utført i R. 95% konfidensintervall ble beregnet ved bruk av eksakt binomial test. Ved beregning av mulige forskjeller ble en p -verdi <0.05 ansett som statistisk signifikant.

2.6.2 Resistensgener i prøvematerialet

Resultatene fra DNA-chip med påvisning av resistensgener (ARG) i prøvematerialet ble beregnet som relativ konsentrasjon av ARG til 16S for hvert resistensgen, hvor et positivt treff ble angitt dersom relativ konsentrasjon var høyere enn deteksjonsgrensen satt for hvert assay ($ARG/16S > 0$). Prøver med negativt resultat ($=0$) i 16S-analyse ble utelatt fra videre databehandling og statistiske analyser. Hver prøve ble angitt som enten negativ (ingen ARG > 0) eller positiv (én eller flere ARG > 0), og verdien *Antall ARG* summerer hvor mange resistensgener som har høyere relativ konsentrasjon enn 0. I tillegg ble verdien *Sum ARG* angitt for hver prøve, en verdi som summerer relativ konsentrasjon (ARG/16S) for alle ARG i prøvematerialet.

For videre statistiske analyser i R, ble datamaterialet inndelt etter hvorvidt det kunne sammenlignes mellom år, lokaliteter og prøvetyper (Tabell 3).

I behandlingen av forskjeller mellom vår og høst, ble kun prøvematerialet fra landbrukslokaliteter i 2019 benyttet. Det var kun jordprøver som ble samlet inn for alle tre lokalitetene, så for å unngå påvirkning fra forskjellene mellom vår/høst, ble bare jordprøvene fra 2020 benyttet for å analysere forskjeller mellom lokaliteter. Statistiske analyser av prøvetyper ble gjort for prøvetyper som ble samlet inn i løpet av begge årene, altså jord, snegler, rødkløver, meitemark og mus, men datamaterialet som ble benyttet var fra innsamlingen i 2020 for å få med alle 10 innsamlingsområdene.

Ved beregning av mulige forskjeller ble en p -verdi <0.05 ansett som statistisk signifikant. Generelle lineære modeller ble brukt for alle analysene: *Antall ARG* ble analysert med antagelse om at feilene/residualene fulgte en poisson-fordeling (family=poisson), mens analysene av *Sum ARG*-konsentrasjon antok normalfordelte feil/residualer (family=gaussian).

Tabell 3: Databearbeiding for statistiske analyser av resistensgener i prøvematerialet

Statistiske analyser av	Innsamlingsår	Område	Lokalitet	Prøvetype
Vår/høst	2019	A,B,D,H	Konvensjonell, økologisk	Jord, mus, rødkløver, snegl
Lokalitet	2020	A-J	Konvensjonell, økologisk, øde	Jord
Prøvetype	2019, 2020	A-J	Konvensjonell, økologisk	Jord, meitemark, mus, rødkløver, snegl
Område	2020	A-J	Konvensjonell, økologisk øde	Jord

Resultatene fra DNA-chip med påvisning av resistensgener i prøvematerialet besto av konsentrasjonsforholdet mellom ARG og 16S for hvert gen, hvor et positivt treff ble angitt som høyere enn deteksjonsgrensen for hvert assay (>0). Prøver med negativt resultat ($=0$) i 16S-analyse ble utelatt fra videre databehandling og statistiske analyser. Hver prøve ble angitt som enten negativ (ingen ARG > 0) eller positiv (én eller flere ARG > 0), og verdien *Antall ARG* summerer hvor mange ARG som har høyere verdi enn 0. I tillegg ble verdien *Sum ARG* angitt for hver prøve, en verdi som summerer konsentrasjonen av alle ARG i prøvematerialet per 16S-ekvivalent.

2.6.3 Pesticider og metaller/grunnstoffer i jordprøver

Ut fra analyseresultater for pesticider i jord ble kvantifiserte mengder av alle påviste pesticider i en prøve summert til en *Sumkonsentrasjon* per analyserte prøve. Denne parameteren, *Sumkonsentrasjon pesticid*, er benyttet i korrelasjonsanalyser mot resultater for *Sum ARG*, gjennomført i R.

Variansanalyse for resultater fra grunnstoffanalyse av jordprøver med faktorene lokalitet (A-J) og type prøve (konvensjonell, økologisk, øde), er gjennomført i Minitab 19.

3 Resultater

3.1 Prøver

Totalt ble det samlet inn 644 prøver (Appendiks, Tabell A 2), hvorav 84 jordprøver, 250 rødkløver, 182 snegler, 60 mus og 68 meitemark. Det viste seg at det i praksis ikke alltid var mulig å finne det planlagte antall av alle prøvetyper. Spesielt vanskelig var det å få nok mus, og det var også problemer noen steder med å finne nok snegler i vårsesongene.

Prøvetyperne rødkløver, snegler og mus var valgt ut på grunnlag av et pilotforsøk høsten 2018. Meitemark ble også akseptert våren 2019 hvis det ble funnet lite snegler eller mus, selv om pilotforsøket tydet på at meitemark inneholdt lite relevante bakterier. Dette ble bekreftet ved undersøkelser av meitemark denne våren, og disse ble derfor ikke tatt med i senere innsamlinger. Mus ble samlet inn vår og høst 2019, men ikke i 2020.

Prøvetyperen «snegler» omfattet følgende arter: svartkogsnegl (*Arion ater*), orangeskogsnegl (*Arion fuscus*), hvitflankeskogsnegl (*Arion silvaticus*), brunskogsnegl (*Arion vulgaris*), åkerkjølsnegl (*Deroceras agreste*), nettkjøtsnegl (*Deroceras reticulatum*), krattsnegl (*Arianta arbustorum*), hagesnegl (*Helicidae*), og art ukjent/ikke oppgitt. De seks først artene er nakensnegler, de to siste har skall.

Prøvetyperen «mus» omfattet følgende arter: storskogmus (*Apodemus flavicollis*), småskogmus (*Apodemus sylvaticus*), markmus (*Microtus agrestis*), husmus (*Mus musculus*), klatremus (*Myodes glareolus*), spissmus (art ukjent), og art ukjent/ikke oppgitt. De fem første tilhører ordenen Gnagere, mens spissmus tilhører ordenen Insektetere.

Prøvetyperen «meitemark» ble ikke artsbestemt.

Det ble også samlet inn informasjon om avling, bruk av husdyrgjødsel og pesticider på landbrukslokalitetene og vegetasjon på de øde lokalitetene begge år (Tabell 4).

Tabell 4: Informasjon om prøvetakingsområder og lokaliteter

Område	Fylke	Type lokalitet	Avling / vegetasjon 2019	Husdyrgjødsel / Pesticider 2019	Avling / vegetasjon 2020	Husdyrgjødsel / Pesticider 2020
A	Innlandet	Økologisk Konvensjonell Øde	Korn Korn Skog	Storfe, høns Pesticider -	Korn Korn Skog	Storfe, høns Pesticider -
B	Viken	Økologisk Konvensjonell Øde	Gress Korn Skog	Beitende storfe, øk. gjødsel Pesticider -	Gress Korn Skog	Beitende storfe, øk. gjødsel Pesticider -
C	Agder	Økologisk Konvensjonell Øde			Gress Kløver Skog	Storfe Pesticider -
D	Rogaland	Økologisk Konvensjonell Øde	Gress Gulrot Skog	Storfe Storfe/pesticider-	Potet Potet Skog	Storfe Storfe/Pesticider-
E	Vestland	Økologisk Konvensjonell Øde			Frukt Frukt Skog, gress	Fjørfe Pesticider -
F	Vestland	Økologisk Konvensjonell Øde			Gress Gress Skog, myr	Småfe Storfe/Glyfosfat -
G	Møre og Romsdal	Økologisk Konvensjonell Øde			Gress Gress Skog	Storfe Storfe/Herbicider-
H	Nordland	Økologisk Konvensjonell Øde	Gress Gulrot Skog	Storfe Storfe/Pesticider -	Gress Gulrot Skog	Storfe Storfe/Pesticider -
I	Troms og Finnmark	Økologisk Konvensjonell Øde			Gress Gress Skog	- Glyphosat -
J	Troms og Finnmark	Økologisk Konvensjonell Øde			Gress Gress Skog	Storfe Mineraler -

3.2 Funn av bakterier

E. coli og/eller *Hafnia* spp. ble funnet i 37,8 prosent av prøvene fra 2019. Det var signifikant forskjell mellom vår- og høstprøver når det gjaldt andel prøver med disse bakteriene (hhv. 21,3 og 52,8 prosent, kjiqvadrattest, $p < 0.001$).

3.2.1 *E. coli*

E. coli ble funnet i 27,0 prosent (n=160) av prøvene fra 2019, og i alle prøvetyper (Tabell 5).

Tabell 5: Funn av *E. coli* i ulike prøvetyper.

Prøvetype	Antall prøver undersøkt for <i>E. coli</i>	Antall prøver med <i>E. coli</i>	% prøver med <i>E. coli</i>	95% konfidensintervall
Rødkløver	150	26	17,3	11,6 - 24,4
Snegl	114	20	17,5	11,1 - 25,8
Mus	59	47	79,7	67,2 - 89,0
Meitemark	68	1	1,5	0,04 - 7,9
Jord	24	17	70,8	48,9 - 87,4
Sum	415	111	26,7	22,5 - 31,3

En større andel av prøvene fra økologiske lokaliteter enn fra konvensjonelle inneholdt *E. coli* (hhv. 31,6 og 20,7 prosent, kjikvadrattest $p = 0,10$). For rødkløver var det signifikant større andel prøver med *E. coli* om høsten enn om våren (hhv. 27,5 og 5,7 prosent, kjikvadrattest $p = 0,001$).

Jord var den eneste prøvetypen som ble samlet inn fra alle tre typer lokalitet. *E. coli* ble funnet i 75 prosent av prøvene fra øde lokaliteter, 87,5 prosent fra økologiske lokaliteter og 50,0 prosent fra konvensjonelle lokaliteter. Forskjellen mellom områdene var ikke statistisk signifikant.

Høyest andel prøver med *E. coli* ble naturlig nok funnet hos mus, ettersom denne bakterien forventes å være en del av tarmens normalflora. Inkludert i denne gruppen var åtte spissmus, hvor det bare ble funnet *E. coli* hos to (25,0 prosent). Hos de resterende musene ble det funnet *E. coli* hos 84,3 prosent, og det var ingen tydelige forskjeller mellom områder, mellom økologisk og konvensjonell, eller mellom vår og høst.

3.2.2 *Hafnia* spp.

Hafnia spp. ble funnet i totalt 49 prøver, dvs. i 14,6 prosent av de (antall) prøvene hvor det ble lett etter disse bakteriene (Tabell 6). Også for *Hafnia* spp. var meitemark prøvetypen med lavest andel funn. Det ble funnet en statistisk signifikant forskjell mellom vår og høst, der andelen prøver med *Hafnia* spp. var hhv. 7,1 og 27,0 prosent (kjikvadrattest, $p = 0,0001$). Prøver av meitemark er ikke inkludert i denne sammenligningen, siden de bare ble undersøkt om våren. Det var ingen forskjell mellom lokaliteter når det gjaldt andel prøver med *Hafnia* spp.

Tabell 6: Funn av *Hafnia* spp. i ulike prøvetyper. Antall prøver totalt omfatter bare prøver hvor det ble lett etter *Hafnia*, dvs. i alle prøver tatt om våren og prøver tatt om høsten hvor det ikke ble funnet *E. coli*.

Prøvetype	Antall prøver undersøkt for <i>Hafnia</i> spp.	Antall prøver med <i>Hafnia</i> spp.	% prøver med <i>Hafnia</i> spp.	95% Konfidensintervall
Rødkløver	128	15	14,7	6,7 - 18,6
Snegl	101	23	24,8	15,0 - 32,2
Mus	24	5	20,8	7,1 - 42,2
Meitemark	68	2	2,9	0,4 - 10,2
Jord	15	2	13,3	1,7 - 40,5
Sum	335	49	14,6	11,0 - 18,9

3.3 Resistens hos isolerte bakterier

3.3.1 *E. coli*

Fenotypisk resistens ble funnet hos til sammen 17 *E. coli* isolater fra åtte prøver (Tabell 7, Appendiks Tabell A 3). Det innebærer at resistente bakterier ble funnet i 7,2 prosent av prøvene med *E. coli* og i 1,9 prosent av det totale antall prøver. Alle isolatene viste resistens mot ampicillin og /eller kloramfenikol. I tillegg ble resistens mot sulfamethoxazole, tetrasyklin og streptomycin observert hos et isolat og resistens mot streptomycin hos et annet.

Et utvalg av de resistente isolatene ble helgenomsekvensert, samt testet på DNA-chip. Det var full overenstemmelse mellom resultatene fra DNA-chipen og helgenomsekvenseringen. Det var også meget godt samsvar mellom fenotype og genotype, bortsett fra hos to identiske isolater fra samme prøve (2019-01-3820-11-1 og -2). Disse isolatene hadde også genene *sul2* for resistens mot sulfonamider, og *strA* og *strB* for streptomycinresistens, men uttrykte ingen av disse resistensene fenotypisk.

For ett av isolatene (2019-60-1860-20-2) ble det i tillegg påvist genet *intl1*. Dette genet koder for integrasen hos et integron, dvs et genetisk element som gjør at bakterien lettere kan ta opp resistensgener fra andre bakterier. Isolatet var resistent mot hele fire typer antibiotika, mens de andre kun var resistente mot en eller to.

Tabell 7: Prøver med *E. coli* som viste fenotypisk resistens. Fra hver av disse prøve ble det testet tre isolater, og resultater fra alle disse er inkludert, selv om ikke alle viste resistens. For isolater som er helgenomsekvensert er det også angitt sekvenstype (ST) og påviste resistensgener. Genene gir resistens mot følgende antimikrobielle stoffer: blaTEM - betalaktamer, cat - fenikoler, flo - fenikoler, sul - sulfonamider, tet - tetrasyklin, str - streptomycin. Genet intl1 koder for et integron, dvs et genetisk element som gjør at bakterien lettere kan oppta resistensgener fra andre bakterier.

Område Type lokalitet Sesong	Prøve- type	Prøve nummer	Isolat nr	Antibiotika som hvert isolatet uttrykker resistens mot	ST	bla TEM	cat	flo	sul	tet	str	intl
A Økologisk Høst	Rød- kløver	2019-01- 3544-3	1	Ampicillin, kloramfenikol	362	1B	A1**					
			2	Ampicillin, kloramfenikol	II	1B	A1**					
			3	Ampicillin, kloramfenikol	*							
	Rød- kløver	2019-01- 3544-5	1	Ampicillin, kloramfenikol	362	1B	A1**					
			2	Ampicillin, kloramfenikol	362	1B	A1**					
			3	Ampicillin, kloramfenikol	*							
	Rød- kløver	2019-01- 3544-9	1	Ampicillin, kloramfenikol	362	1B	A1**					
			2	Ampicillin, kloramfenikol	362	1B	A1**					
			3	Ampicillin, kloramfenikol	*							
	Snegle	2019-01- 3544-20	1	Ampicillin, kloramfenikol	362	1B	A1**					
			2	Ampicillin, kloramfenikol	362	1B	A1**					
			3	Ampicillin, kloramfenikol	*							
B Konvensjonell Høst	Mus	2019-01- 3942-4	1	Ingen	*							
			2	Ingen	*							
			3	Ampicillin	1157	1D						
D Økologisk Vår	Snegle	1019-60- 1860-20	1	Ingen	*							
			2	Ampicillin, sulfameth., tetrasyklin, streptomycin	69	1C			2	A	A,B**	1
			3	Ingen	*							
D Økologisk Høst	Jord	2019-01- 3820-1	1	Kloramfenikol	2522			R	2		A**,B	
			2	Kloramfenikol	2522			R	2		A**,B	
			3	Ingen	*							
	Rød- kløver	2019-01- 3820-11	1	Streptomycin	*							
			2	Ingen	*							
			3	Ampicillin	*							

* isolatet er ikke sekvensert, ** gen med 100 % dekning, men <100 % identitet, II = Ikke identifisert

Prøver med resistente *E. coli* ble funnet i tre av fire områder (A, B og D), og fra alle prøvetyper unntatt meitemark. Fra økologisk lokalitet i område D, ble det funnet resistente *E. coli* både vår og høst. Isolatene fra de to sesongene hadde ikke samme resistensmønster, og de av isolatene som ble helgenomsekvensert hadde heller ikke samme sekvenstype (Tabell 7).

Fra økologisk lokalitet i område A viste alle isolater fra fire av prøvene (tre rødkløver og en snegle) samme resistensmønster. To isolater fra hver prøve ble helgenomsekvensert, og av disse åtte var syv identiske. Dette kan tyde på en felles kilde.

3.3.2 *Hafnia* spp.

Hafnia spp. er bakterier som finnes i tarmen hos pattedyr, fugler, fisk, reptiler, invertebrater, flaggermus og insekter. De finnes også i jord, vann, matvarer og kloakk. Dette er derfor en aktuell gruppe bakterier for studier av forekomst av antibiotikaresistens i miljø. Siden det ikke

er fastsatt spesifikke cut-off verdier ved sensitivitetstesting av *Hafnia* spp., var disse isolatene i utgangspunktet planlagt vurdert opp mot cut-off verdiene for Enterobacterales anbefalt av EUCAST. Enterobacterales er en bakterieorden som bl.a. omfatter *Enterobacteriaceae* som *Hafnia* spp. tilhører.

Innledende undersøkelser antydte tilstedeværelse av de samme resistensformer som påvist i *E. coli* isolatene (Appendiks Tabell A 4). Helgenomsekvensering av to referansestammer og et utvalg av de innsamlede isolatene viste imidlertid unike karakteristika som ikke tidligere har vært kjent. Standard bioinformatiske pipeline verktøy, som brukes på helgenomsekvensdata for andre mer klinisk relevante bakterier som f.eks. *E. coli*, kunne ikke uten videre overføres på *Hafnia* spp. Dette påvirker vurderingene av forekomsten av resistens. Det bør derfor gjøres flere undersøkelser før det er faglig riktig å trekke noen slutninger.

3.4 Resistensgener i prøvematerialet

3.4.1 Påvisning av mikrobielt DNA (16S)

Det ble påvist mikrobielt DNA (16S) i 638 av 644 analyserte prøver (Tabell 8). Én prøve ble forkastet grunnet kontaminering under DNA-isolasjon og ble ikke analysert. De seks prøvene som ble negative i 16S-analysen stammer fra fire jordprøver og to prøver fra meitemark. Det antas at negative 16S-prøver inneholdt inhibitorer som forhindret PCR-amplifikasjon og disse prøvene ble derfor ekskludert fra videre databehandling og beregninger.

3.4.2 Positive prøver

Prøver ble angitt som positive ved påvisning av én eller flere antibiotikaresistensgener ($ARG/16S > 0$), og verdien *Antall ARG* summerer hvor mange resistensgener (ARG) som ble påvist over deteksjonsgrensen. For hver prøve ble det også beregnet verdien *Sum ARG* som summerer relativ konsentrasjonen av alle ARG i prøvematerialet per ekvivalent av 16S. Det ble påvist tilstedeværelse av antibiotikaresistensgener i totalt 383 prøver (60 % av 16S-positive prøver). Tabell 8 oppsummerer resultatene for alle områder, prøvetyper og lokaliteter slått sammen for 2019 og 2020.

Prøven med høyeste *Sum ARG*-verdi ble funnet i et konvensjonelt felt i Viken (B) i 2020, en snegl innsamlet på våren, som viste en relativ konsentrasjon på 58,8 ARG/16S fordelt på 9 ulike ARG. Det høyeste *Antall ARG* som ble påvist i prøvene var 12 ARG, og prøvene stammet fra økologiske lokaliteter i område J (jord, vår 2020) og område D (rødkløver, høst 2019).

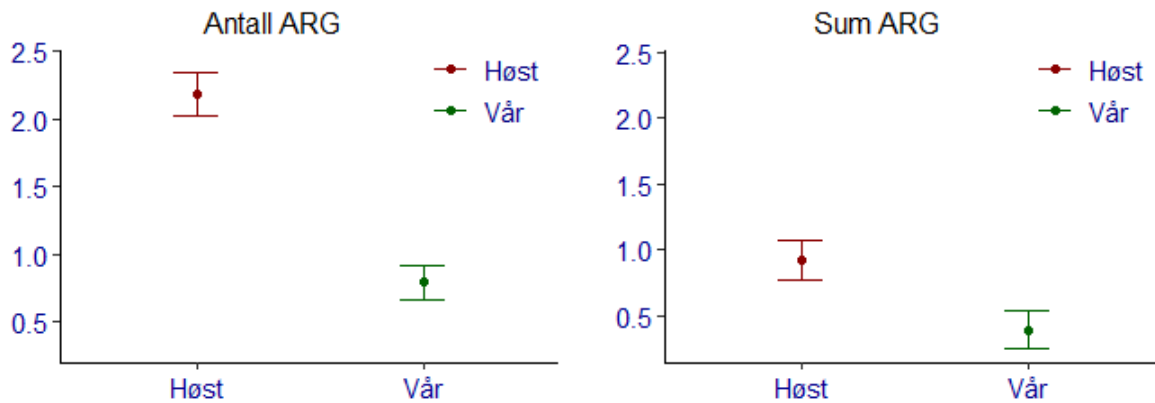
Tabell 8: Påvisning av mikrobielt DNA (16S) og antibiotikaresistensgener (ARG) i ulike områder. Totalt antall prøver omfatter analyserte prøver, og prosentandelen positiv ARG er beregnet fra antallet prøver positive for 16S. Gjennomsnittlig Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hvert innsamlingsområde. .

Område	Fylke	Antall prøver			% positiv ARG	Gj.snitt Antall ARG	Gj.snitt Sum ARG
		Totalt	Positiv 16S	Positiv ARG			
A	Innlandet	106	105	59	56,2	1,28	0,68
B	Viken	125	125	88	70,4	1,78	1,10
C	Agder	26	26	21	80,8	1,73	1,71
D	Rogaland	152	151	102	67,5	1,92	0,72
E	Vestland	22	22	14	63,6	1,45	0,23
F	Vestland	26	26	14	53,8	2,00	0,73
G	Møre og Romsdal	26	26	13	50,0	1,15	0,23
H	Nordland	126	122	56	45,9	1,11	0,70
I	Troms og Finnmark	19	19	10	52,6	0,84	0,19
J	Troms og Finnmark	16	16	6	37,5	1,13	0,85
Totalsum		644	638	383	60,0	1,53	0,77

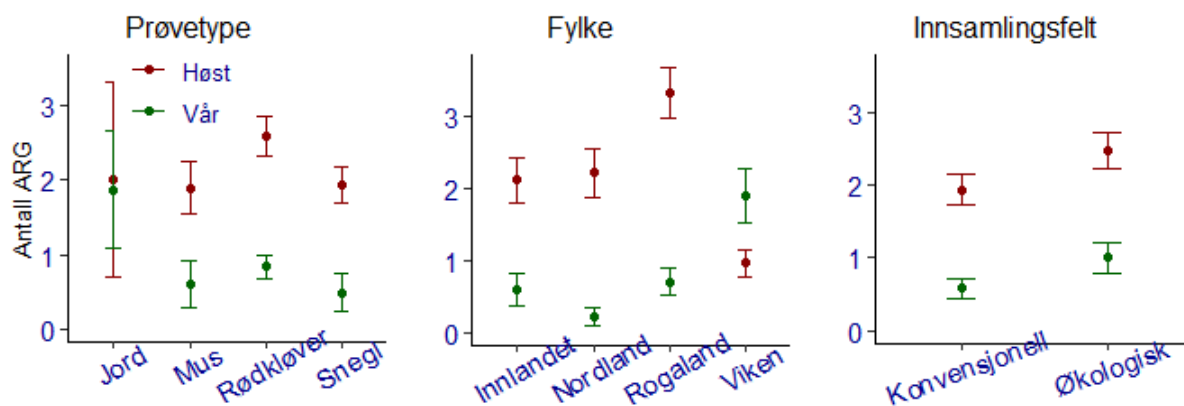
Hver enkelt ARG angis som et forholdstall relatert til påvist konsentrasjon av 16S i prøven. Ved ARG-verdier høyere enn 1 ekvivalent til 16S ($ARG > 1$) antas det som sannsynlig at prøven inneholder en stor andel bakterier som uttrykker resistensgenet genotypisk. Resultatene viste at 42 prøver fra 2019 (10,3 prosent) og 32 prøver fra 2020 (14,0 prosent) hadde én eller flere ARG påvist med over 1 ekvivalent til 16S ($ARG > 1$). De påviste resistensgenene var (antall prøver i parentes) *int11* (10), *aac6* (2), *aac3* (2), *ant3* (4), *aph3* (2), *bla_{ACT}* (1), *bla_{DHA}* (6), *bla_{SHV}* (1), *bla_{TEM}* (14), *catA* (5), *dfrA* (1), *oqxA* (9), *oqxB* (10), *strA* (11), *strB* (12), *sul1* (2), *sul2* (8), *tetA* (1), *tetB* (3), *tetM* (18).

3.4.3 Innsamlingstidspunkt

I 2019 ble det samlet inn prøvemateriale (jord, rødskløver, snegl og mus) både vår og høst ved økologiske og konvensjonelle lokaliteter. Det ble funnet henholdsvis 73,4 og 38,3 prosent ARG-positive prøver blant høst- og vårprøvene, en forskjell som ble vurdert statistisk signifikant (generell lineær modell, $p < 0.001$) også for Antall ARG og Sum ARG-konsentrasjon (Figur 3). Forskjellen gjør seg også gjeldende dersom man ser på Antall ARG fordelt på prøvetype, innsamlingsområde og type lokalitet (Figur 4).



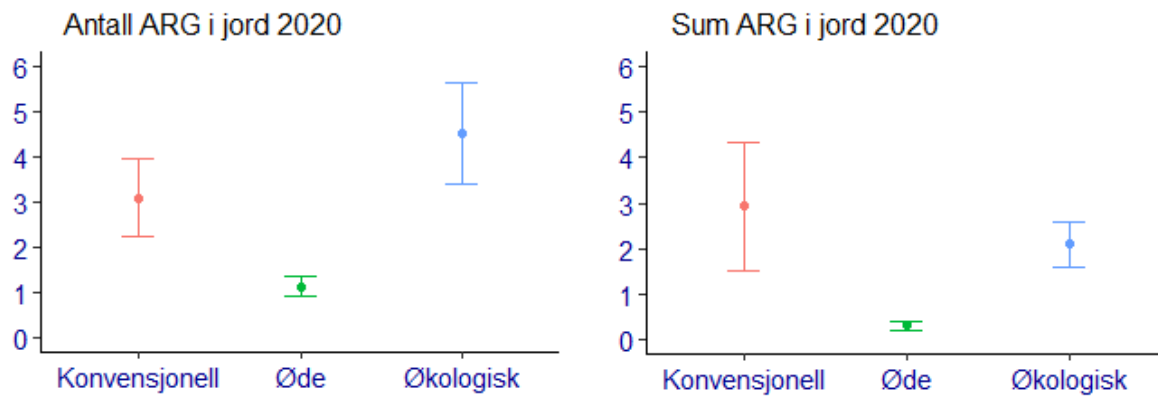
Figur 3: Gjenomsnitt av Antall ARG og Sum ARG-konsentrasjon vår og høst i 2019 for jord, rødkløver, snegl og mus som ble samlet inn i fire områder (A,B,D,H) ved både konvensjonelle og økologiske lokaliteter. Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hver prøve. Error bars er +/- standardfeil.



Figur 4: Gjenomsnitt av Antall ARG vår og høst i 2019 fordelt på prøvetype, fylke og type lokalitet. Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hver prøve. Error bars er +/- standardfeil.

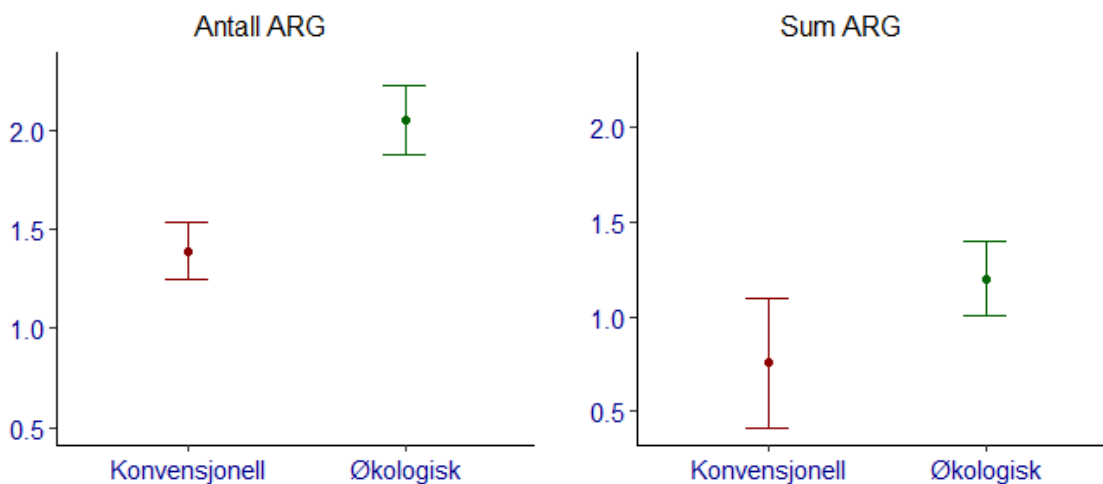
3.4.4 Lokaliteter

Det var kun jordprøver som ble samlet inn fra alle tre lokaliteter (konvensjonell, økologisk og øde). For å unngå påvirkning fra forskjeller mellom innsamling vår og høst, ble kun jordprøvene fra 2020 brukt i databehandlingen. I konvensjonelle, økologiske og øde lokaliteter ble det funnet henholdsvis 90, 90 og 70 prosent prøver positive for ARG. Det ble funnet signifikant forskjell mellom øde lokaliteter og jordbrukslokaliteter, både for *Antall ARG* og *Sum ARG* (generell lineær modell, $p > 0.01$) (Figur 5). Gjennomsnittlig *Antall ARG* og *Sum ARG*-konsentrasjon viste betydelig lavere verdier ved øde lokaliteter sammenlignet med konvensjonelle og økologiske lokaliteter, selv om andelen positive prøver var tilsvarende for alle lokalitetene.



Figur 5: Gjennomsnittlig Antall ARG og gjennomsnittlig Sum ARG-konsentrasjon for alle jordprøver samlet inn våren 2020 ved tre ulike lokaliteter (konvensjonell, økologisk og øde) i 10 ulike innsamlingsområder (A-J). Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hver prøve. Error bars er +/- standardfeil.

Ved å analysere alle prøvetypene (jord, snegl, rødkløver) fra konvensjonelle og økologiske lokaliteter fra de områdene som ble prøvetatt begge år (A, B, D, H) ble det påvist et noe høyere gjennomsnittlig *Antall ARG* ved økologiske lokaliteter sammenlignet med konvensjonelle lokaliteter (generell lineær modell, $p < 0.05$) (Figur 6). For *Sum ARG*-konsentrasjon, ble det ikke påvist noen signifikant forskjell mellom økologiske og konvensjonelle lokaliteter (Figur 6).



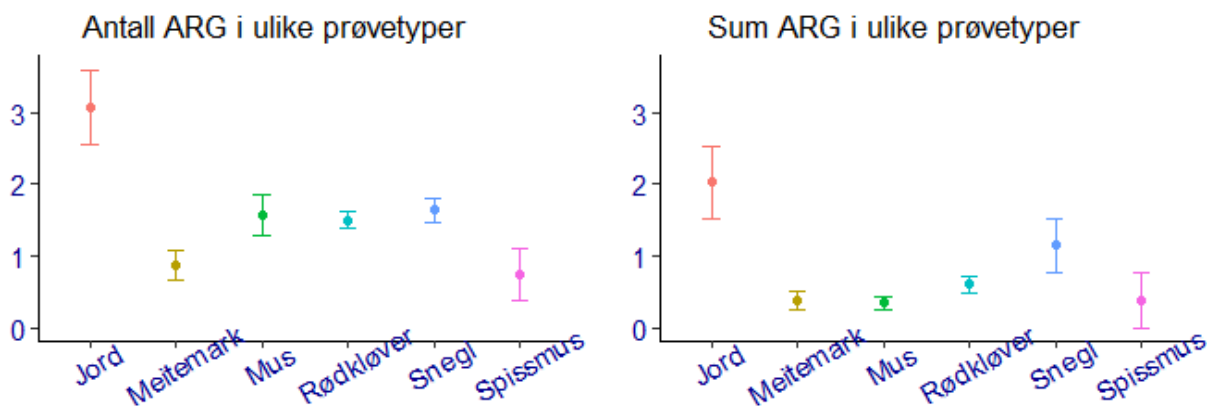
Figur 6: Gjennomsnittlig Antall ARG og gjennomsnittlig Sum ARG-konsentrasjon for konvensjonelle og økologiske lokaliteter i fire ulike innsamlingsområder (A,B,D,H) for prøvetypene jord, snegl og rødkløver samlet inn i 2019 og 2020. Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hver prøve. Error bars er +/- standardfeil.

3.4.5 Prøvetyper

Det ble i løpet av 2019 og 2020 samlet inn fem ulike prøvetyper ved konvensjonelle og økologiske lokaliteter. Størst andel ARG-positive prøver ble funnet i jordprøvene (81,8 prosent), mens meitemark ga lavest andel positive prøver (45,5 prosent), se Tabell 9. Jordprøvene hadde betydelig høyere både *Antall ARG* og *Sum ARG*-konsentrasjon sammenlignet med de andre prøvetypene (generell lineær modell, $p > 0.01$) (Figur 7).

Tabell 9: Påvisning av mikrobielt DNA (16S) og antibiotikaresistensgener (ARG) for fem ulike prøvetyper samlet inn ved konvensjonelle og økologiske lokaliteter i 2019 og 2020. Prosentandelen positiv ARG er beregnet fra antallet prøver positive for 16S.

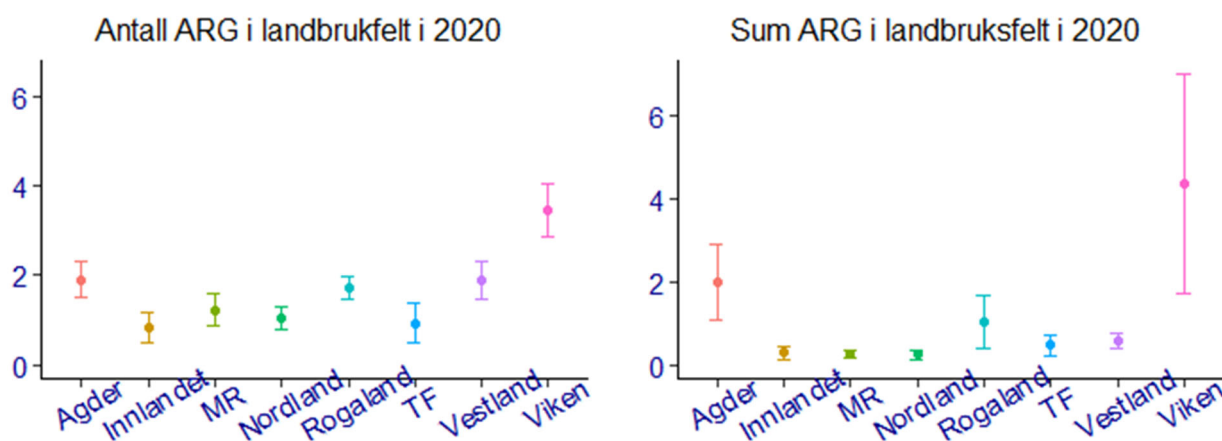
Prøvetype	Antall prøver			% positiv ARG
	Totalt	Positiv 16S	Positiv ARG	
Jord	36	33	27	81,8
Meitemark	68	66	30	45,5
Mus	60	60	37	61,7
Rødkløver	250	250	147	58,8
Snegl	182	182	111	61,0
Totalsum	596	591	352	59,6



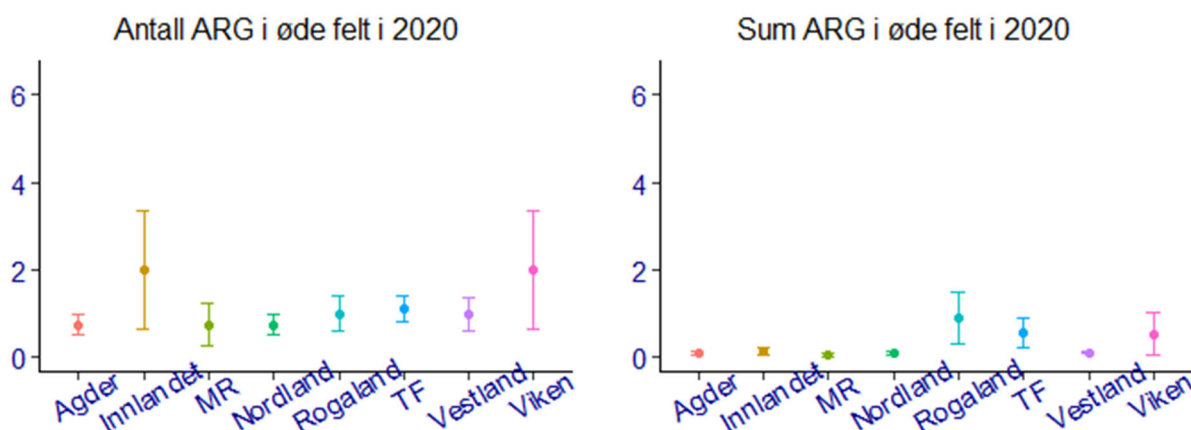
Figur 7: Gjennomsnittlig Antall ARG og Sum ARG-konsentrasjon for ulike prøvetyper samlet inn ved konvensjonelle og økologiske lokaliteter i 2019 og 2020. Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hver prøve. Error bars er +/- standardfeil

3.4.6 Innsamlingsområder

I 2020 ble det samlet inn prøver fra ti områder (A-J) i åtte fylker ved konvensjonelle, økologiske og øde lokaliteter. Figur 8 viser gjennomsnittlig *Antall ARG* og *Sum ARG* for alle prøvetyper (jord, snegl og rødkløver) samlet inn i konvensjonelle og økologiske lokaliteter fordelt på fylke, mens figur 9 viser tilsvarende data for jordprøver samlet ved øde lokaliteter.



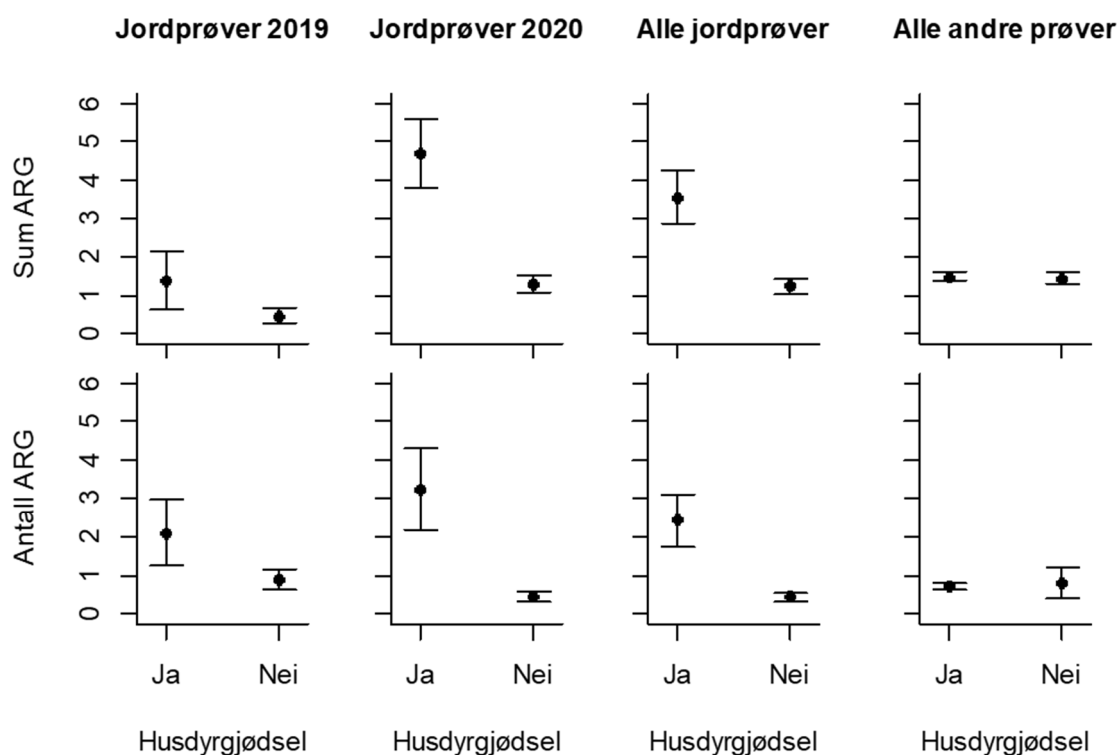
Figur 8: Påvisning av ARG i prøver (jord, snegl og rødcløver) fra ulike fylker ved prøvetaking i konvensjonelle og økologiske lokaliteter i 2020. MR: Møre og Romsdal, TF: Troms og Finnmark. Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hver prøve. Error bars er +/- standardfeil.



Figur 9: Påvisning av ARG i jordprøver fra ulike fylker ved prøvetaking i øde lokaliteter i 2020. MR: Møre og Romsdal, TF: Troms og Finnmark. Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hver prøve. Error bars er +/- standardfeil.

3.4.7 Husdyrgjødsel

Ved innsamling ble det registrert hvorvidt lokalitetene var behandlet med husdyrgjødsel og pesticider. Figur 10 viser gjennomsnittlig *Antall ARG* og *Sum ARG* for jordprøvene samlet i konvensjonelle, økologiske og øde lokaliteter fordelt etter behandling med husdyrgjødsel eller ikke. Analysene viser høyere *Antall ARG* og *Sum ARG* for jordprøvene hvor det er behandlet med husdyrgjødsel (generell lineær modell, $p < 0.01$), men ikke for de andre prøvetypene (mus, meitemark, rødcløver og snegl).



Figur 10: Gjennomsnittlig Antall ARG og gjennomsnittlig Sum ARG-konsentrasjon i forhold til bruk av husdyrgjødsel for konvensjonelle, økologiske og øde lokaliteter. Alle andre prøver er alle prøver foruten jord og omfatter mus, meitemark, rødcløver, snegl og spissmus. Antall ARG og Sum ARG angir henholdsvis hvor mange ARG som ble påvist og relativ konsentrasjon av alle ARG per 16S-ekvivalent for hver prøve. Error bars er +/- standardfeil.

3.4.8 Sammenligning av genotyper i originalt prøvemateriale og isolater

Påvisning av resistensgener i det opprinnelige prøvematerialet ble sammenlignet med resistensgener påvist hos *E. coli*-isolater fra det samme prøvematerialet ved både helgenomsekvensering og DNA-chip. Totalt ble seks prøver sammenlignet (Appendiks Tabell A 5). For alle seks prøvene ble de samme resistensgenene påvist i prøvematerialet som hos isolatene.

I en rødcløverprøve (2019-01-3544-5) fra område A ble det påvist flere resistensgener (>1,0 ARG/16S) i det originale prøvematerialet enn i *E. coli*-isolatene. I tillegg til *bla*_{TEM} og *catA* som ble påvist i isolatene fra denne prøven, ble det påvist *strA*, *strB*, *sul2* og *tetB* i det originale prøvematerialet.

Resultatene fra DNA-chip viser at prøvemateriale hvor *Sum ARG* var høy (> 5 ARG/16S) hadde sammenheng med funn av isolater med fenotypisk resistens. Et unntak fra dette var en prøve fra mus i område B (2019-01-3942-4) som viste fenotypisk resistens mot ampicillin (genotype: *bla*_{TEM}), men som kun hadde en *Sum ARG*-konsentrasjon på 0,76 ARG/16S i det originale prøvematerialet.

Dyrkning av prøvene ble kun foretatt i 2019, og ved å filtrere ut prøver fra 2019 med *Sum ARG* > 5 ΣARG/16S ble det funnet totalt 14 prøver (Appendiks Tabell A 6), hvorav fem av dem ga

opphav til *E. coli*-isolater med fenotypisk resistens. For 2020 var det ti prøver med *Sum ARG* > 5 Σ ARG/16S, men det ble da ikke foretatt noen dyrkning dette året.

3.5 Forekomst av antibiotika og tungmetaller i jord

Det ble ikke påvist rester av antibiotika i jordprøvene samlet inn i 2019, på tross av at det ble gjort en bred screening etter aktuelle stoffer. Analysene inkluderte de typene antibiotika som ga positivt utslag i resistenstesting av isolerte bakterier. Det ble på bakgrunn av disse resultatene valgt å ikke analysere for rester av antibiotika i jord i 2020.

Prøver tatt ut høsten 2019, totalt 12 prøver, er analysert for en rekke grunnstoffer. Det var ingen statistisk signifikante forskjeller i disse resultatene verken for område eller type jordprøve (konvensjonell, økologisk, øde) (Appendiks, Tabell A 7).

3.6 Forekomst av pesticider i jord

Flere pesticider, både ugras-, sopp- og insektmiddel, ble påvist og verifisert i jordprøvene (Tabell 10).

Tabell 10: Sumkonsentrasjoner av pesticider påvist i jordprøver(0-5 cm jordsjikt) fra prøveuttak i 2019 og 2020. Sumkonsentrasjoner er kvantifiserte mengder av alle påviste pesticider i en prøve summert. Alle konsentrasjoner er angitt i mikrogram pr kg tørr jord (μg pesticid/kg tørr jord) \pm standardavvik. Områder og prøve kategorier uten funn av pesticider er vist med n.d.

Område	Fylke	Konvensjonell	Økologisk	Øde
A*	Innlandet	15 \pm 16	17 \pm 29	0,05 \pm 0,13
B*	Viken	113 \pm 58	0,94 \pm 1,0	0,12 \pm 0,18
C ^s	Agder	1,9	n.d.	n.d.
D*	Rogaland	245 \pm 164	10 \pm 17	5,3 \pm 8,0
E ^s	Vestland	165	n.d.	n.d.
F ^s	Vestland	n.d.	n.d.	n.d.
G ^s	Møre og Romsdal	n.d.	n.d.	n.d.
H*	Nordland	150 \pm 28	0,22 \pm 0,39	n.d.
I ^s	Troms og Finnmark	n.d.	n.d.	n.d.
J ^s	Troms og Finnmark	n.d.	n.d.	n.d.

*Gjennomsnitt 2019 og 2020 beregnet på grunnlag av tre prøver for konvensjonell og økologisk, og seks prøver for øde områder. ^sData fra 2020 med verdien for konvensjonell og økologisk basert på en prøve mens verdien for øde er gjennomsnitt av fire prøver.

3.6.1 Pesticider i jord fra ulike typer lokalitet

I 2019 ble det gjort analyser av pesticider i jordprøver fra fire områder (A, B, D, H). Resultatene fra lokaliteter med konvensjonell produksjon viste at prøver fra kornfeltene i de to områdene i Viken og Innlandet (Appendiks, Tabell A 8) inneholdt overveiende soppmidler, med høyest påviste nivåer (> 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$) for propikonazol, prokvinazid, fludioksonil, difenokonazol, prokloraz og mandipropamid. Propikonazol ble påvist til henholdsvis 37 og 11 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i vår- og høstprøve fra området i Viken. Ugrasmidlene fluroksypyr, prosulfokarb og diflufenikan ble også påvist over 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$, hvorav fluroksypyr ble påvist i mengde nær 21 $\mu\text{g}/\text{kg}$ i vårprøven fra Viken. Åtte nedbrytningsprodukter (metabolitter) av pesticider ble også påvist.

De fleste av disse ble påvist i lave nivåer, med unntak av protiokonazol-destio og trifloxystrobinsyre (CGA 321113) som ble påvist i nivåer over 5 µg/kg. Av disse fire prøvene var det vårprøven tatt ut i området i Viken som viste høyest *Sumkonsentrasjon* av pesticider (114 µg/kg).

Jordprøver tatt ut fra lokaliteter med konvensjonell gulrotproduksjon i ett område i Rogaland og ett i Nordland inneholdt flere ulike pesticider (Appendiks, Tabell A 9), og de midlene som ble påvist i konsentrasjoner over 5 µg/kg inkluderte soppmidlene boskalid (maks. påvist 259 µg/kg) og pyraklostobin (maks. påvist 23 µg/kg) og ugrasmidlene klomazon (maks påvist 82 µg/kg) og metribuzin (maks påvist 26 µg/kg). Insektmidlet lambda-cyhalotrin ble også påvist i konsentrasjon over 5 µg/kg i lokaliteten i Nordland. Tre nedbrytningsprodukter ble også påvist i jordprøvene, deriblant en metabolitt av soppmidlet pyraklostrobin (BF 500-6). Høstprøven tatt ut i Rogaland viste høyest *Sumkonsentrasjon* av pesticider, med 292 µg/kg. Det var også høstprøven som viste høyest *Sumkonsentrasjon* i området i Nordland (179 µg/kg).

Tilsvarende ble det i 2020, i prøver fra lokaliteter med konvensjonell produksjon av korn (Viken og Innlandet), potet (Rogaland), gulrot (Nordland), og frukt (Vestland), påvist plantevernmidler (Appendiks, Tabell A 10). Jordprøven fra potetdyrking i Rogaland viste høyest *Sumkonsentrasjon* av plantevernmidler (380 µg/kg) av alle prøvene for 2019 og 2020. Det var soppmidler som ble påvist i høyeste konsentrasjoner i denne prøven, med penconazol, fenheksamid, fluopyram og pyrimetanil påvist på hhv. 91, 74, 67 og 34 µg/kg. Av insektmidler var det indoksakarb og spirotetramat (med metabolitter) som ble påvist i høyeste konsentrasjoner i denne prøven, med hhv. 55 og 45 µg/kg. I prøven fra kornarealet i Viken var det ugrasmidlet diflufenikan og en metabolitt av soppmidlet protiokonazol som ble påvist i høyest konsentrasjon med hhv. 76 og 52 µg/kg. Jord fra lokaliteten med fruktproduksjon i Vestland viste høyeste nivåer av soppmidlene boskalid (103 µg/kg), pencycuron (45 µg/kg) og pyraklostrobin med metabolitter (sum 14 µg/kg). Lokaliteten med gulrotproduksjon i Nordland viste, som i 2019, høyest nivåer av soppmidlet boskalid (46 µg/kg), ugrasmidlet metribuzin (49 µg/kg) og insektmidlet lambda-cyhalotrin (21 µg/kg).

I 2020 var også fem lokaliteter med grasproduksjon (Agder, Møre og Romsdal, Sogn og Fjordane, Troms og Finnmark) inkludert i prøvetakingen. Det ble i hovedsak ikke påvist rester av pesticider i jorda i disse lokalitetene, verken fra områder med konvensjonell eller økologisk produksjon. Eneste unntak var to funn av pesticid i lav konsentrasjon (<1µg/kg) i jordprøve fra konvensjonell produksjon i Agder.

Svært få rester av pesticider ble påvist i jord fra areal med økologisk produksjon. I 2019 viste analyser av jordprøver fra økologisk lokalitet i ett av områdene i Viken rester av soppmidlet imazalil i svært lave nivåer (<0,25 µg/kg), noe som kan være på grunn av avdrift eller avrenning etter sprøyting på nærliggende areal. Prøver fra to av de økologiske lokalitetene var helt frie for rester. Tilsvarende for 2020 ble det kun gjort et fåtall funn i områder med økologisk produksjon, men det var funn i to prøver i *Sumkonsentrasjoner* opp mot 20-40% av tilsvarende for lokaliteter med konvensjonell dyrking. Ved lokalitetene i Innlandet og Rogaland ble det påvist rester av pesticider i jord fra areal med økologisk produksjon, etter dyrking av henholdsvis korn og potet. For lokaliteten i Innlandet kan det ha skjedd en forbygging av prøver da det ikke var funn i prøve fra konvensjonell lokalitet, mens det ble påvist en *Sumkonsentrasjon* av pesticider tilsvarende 50,4 µg/kg tørr jord på økologisk lokalitet. Dette har imidlertid ingen innvirkning på tolkningen av resultatene i forhold til sammenheng med antimikrobiell resistens. På området i Rogaland ble det påvist en *Sumkonsentrasjon* av

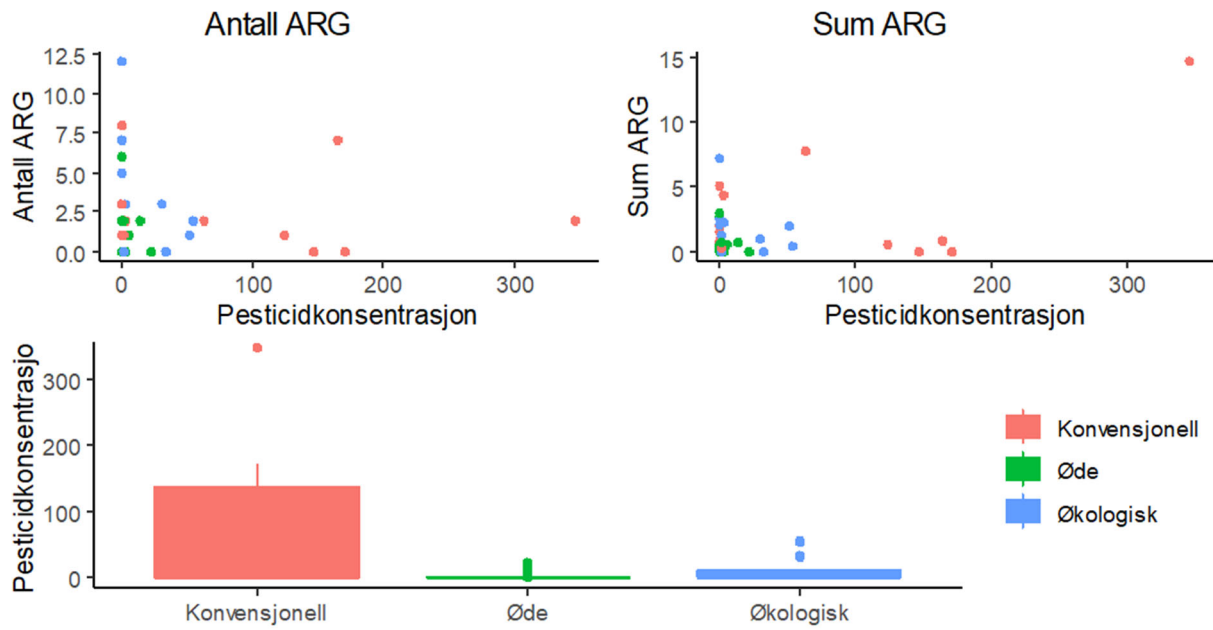
pesticider på 29,8 µg/kg tørr jord på økologisk lokalitet, men dette er et område hvor avdrift og avrenning etter sprøyting på nærliggende areal ikke er usannsynlig og hvor kort- og langtransport med vind og regn ikke kan utelukkes. Det var soppmidlet boskalid, som benyttes i en rekke bær- og grønnsakkulturer samt i produksjon av raps, som ble påvist i høyest konsentrasjon her (24,5 µg/kg tørr jord).

Prøveresultatene fra øde lokaliteter indikerer at det generelt ikke påvises pesticider i jord i slike lokaliteter, med unntak av områder der det kun er små lokaliteter som kan klassifiseres som øde og det ikke kan ses bort fra påvirkning fra nærliggende lokaliteter med konvensjonell jordbruksproduksjon. I 2019 ble det påvist rester i svært lave konsentrasjoner i to øde lokaliteter. En metabolitt av ugrasmidlet tribenuron-metyl (IN-L5296) ble påvist i lav konsentrasjon (0,35 µg/kg) i jord prøvetatt i juni fra lokaliteten i Viken, mens soppmidlet imazalil ble påvist (0,35 µg/kg) i jord tatt ut på samme lokalitet i september. I jordprøver fra den øde lokaliteten i Rogaland ble det påvist lave nivåer av soppmidlet boskalid (<2,3 µg/kg), noe som kan være på grunn av avdrift eller avrenning etter sprøyting fra nærliggende landbruk. Det er i dette området mulighet for både kort- og langtransportert tilførsel med vind og nedbør. Liknende resultater ble funnet i 2020 da det kun ble påvist pesticider i øde lokaliteter i Rogaland, med funn av soppmidlet boskalid i tre av fire jordprøver. Påviste konsentrasjoner varierte mellom 3 og 20 µg/kg jord.

3.6.2 Sammenligning av *Sumkonsentrasjoner* for pesticider og ARG i jord

Forholdet mellom *Sumkonsentrasjon* pesticider i prøver fra de ulike lokaliteter (konvensjonell, økologisk, øde) er oppsummert i Figur 11 (nederste graf). Av de 77 prøvene med resultater for både pesticider og ARG, ble det påvist pesticider i 25 prøver: ni i konvensjonelle lokaliteter og åtte i økologiske og øde lokaliteter. For de økologiske og øde lokalitetene var det imidlertid generelt svært lave *Sumkonsentrasjoner* pesticider (<<5 µg/kg jord) sammenliknet med de konvensjonelle lokalitetene, med unntak av to felt fra Rogaland i 2020 som er beskrevet nærmere over. Analyser av sammenhengen mellom *Sumkonsentrasjon* pesticider og *Sum ARG-konsentrasjon* viste ingen statistisk signifikans med unntak for ett prøvetakingssted hvor svært høy ARG- og pesticidkonsentrasjon sammenfalt (Figur 11, øverste graf). Fravær av statistisk signifikant sammenheng er ikke uventet da datamaterialet er svært begrenset.

Prøven med sammenfallende høy *Sumkonsentrasjon* av ARG og pesticider i 2020 er tatt ut i område med konvensjonell produksjon i Rogaland. Resultatene fra prøvetakingen i 2019 viser at det også er forholdsmessig høy ARG *Sumkonsentrasjon* (7,7) sett i forhold til pesticidkonsentrasjon (62 µg/kg) i prøven tatt ut om våren i Rogaland. Dette bildet bekreftes imidlertid ikke for prøven tatt ut høst 2019 hvor det er målt en høy pesticidkonsentrasjon (292 µg/kg), men ikke påvist ARG. ARG-analysen av sistnevnte prøve kan imidlertid være underestimert på grunn av inhibitorer i jordprøven som også vises gjennom en lav konsentrasjon av 16S. Det begrensede antallet prøver analysert og variasjonen i konsentrasjonsnivåer og typer av pesticider påvist gjør det vanskelig å trekke spesifikke konklusjoner om mulige sammenhenger mellom pesticider og ARG i jord.



Figur 11: Sumkonsentrasjoner av pesticider i jordprøver fra områder under ulike arealbruk i 2020 (nederst) og sammenheng mellom Antall ARG, Sum ARG-konsentrasjon og Sumkonsentrasjon pesticider i jordprøver samlet i 2019 og 2020 (øverst).

4 Diskusjon

4.1 Forekomst av resistens

Antibiotikaresistente *E. coli* ble funnet i 7,2 prosent av prøvene med *E. coli* når inntil tre isolater per prøve ble undersøkt. I tidligere undersøkelser av norsk villfauna har andel av resistente *E. coli* vært hhv. 7,7 prosent hos rødrev, 3,5 prosent hos reinsdyr og 6,2 prosent hos rådyr ([Rapport rev.](#), [Rapport hjortevilt](#)). I disse studiene ble det imidlertid undersøkt kun ett isolat fra hver prøve. Hadde det samme blitt gjort i denne studien, hadde andelen resistente *E. coli* vært 5,4 prosent, dvs. på samme nivå som de tidligere undersøkelsene. Det ble ikke påvist fenotypisk resistens mot colistin, tredje og fjerde generasjons cefalosporiner eller karbapenemer, dvs antibiotika som regnes som kritisk viktige for behandling av mennesker. Det ble funnet fenotypisk resistens mot ampicillin, kloramfenikol, sulfamethoxazole, tetrasyklin og streptomycin, og det genetiske grunnlaget ble bekreftet ved helgenomsekvensering av aktuelle isolater. Resistens mot disse antibakterielle midlene er tidligere rapportert hos *E. coli* både fra villfauna, fra produksjonsdyr som storfe, gris og fjørfe, og på bladgrønnsaker ([NORM-VET 2017](#), [NORM-VET 2019](#)). Dette understreker behovet for å håndtere antibiotikaresistens i et Én helse perspektiv hvor også miljøet er inkludert.

Ved hjelp av DNA chip ble det påvist minst ett ARG i 60,0 prosent av prøvene. Gener som koder for resistens mot ampicillin, kloramfenikol, sulfamethoxazole, tetrasyklin og streptomycin ble også identifisert i disse undersøkelsene, både i prøver hvor tilsvarende resistente *E. coli* var påvist og i andre prøver. I tillegg ble det også funnet gener som koder for resistens mot andre typer antibiotika, som cefalosporiner og penemer. Disse kan være fra andre bakterier i prøven eller fra *E. coli* som ikke ble isolert. Det finnes ikke noen tilsvarende tidligere studier å sammenligne dette med, og det foreligger i litteraturen kun studier av enkelte ARG, se review [19]. Imidlertid vil resistensgener alltid forekomme naturlig i miljøet fordi antimikrobielle stoffer produseres av mikroorganismer som sekundære metabolitter, og resistensgenene er en del av mikrobiotaens forsvarsmekanismer.

Høstprøver hadde en større andel resistensgener enn vårprøver, både i konsentrasjon og antall. Samme tendens ble observert for resistente *E. coli* hvor bare én av de åtte positive prøvene var fra våren. En større andel høstprøver enn vårprøver hadde også funn av bakterier, både *E. coli* og *Hafnia* spp. Dette kan skyldes en oppformering av bakterier i denne perioden og/eller at bakterier ble tilført og spredd på ulike måter i løpet av sommeren. Det samme kan ha skjedd med resistente bakterier. Enkeltfunnet av fire prøver (tre rødkløver og snegl) med identiske resistente *E. coli* fra samme område og lokalitet kan tyde på en spredning fra en felles, ukjent kilde. Dataene fra denne undersøkelsen kan imidlertid ikke si om eller i hvilken grad dette eventuelt kan ha påvirket den observerte forekomsten av resistente bakterier.

Ingen av prøvene med resistente *E. coli* var fra øde lokaliteter, og det ble påvist en signifikant lavere forekomst av ARG i prøvene fra øde lokaliteter i forhold til landbrukslokalitetene. Dette antyder at nærhet til menneskelig aktivitet gir større risiko for tilstedeværelse av antibiotikaresistens, noe som også ble indikert av undersøkelsen på rødrev ([Rapport rev.](#)) [20].

At det var en høyere andel prøver totalt med tarmbakterien *E. coli* på økologiske lokaliteter enn på konvensjonelle, kan indikere en tilførsel av disse bakteriene gjennom bruk av husdyrgjødsel. Resultatene viste også en høyere forekomst av ARG i jordprøver hvor det var

brukt husdyrgjødsel. Hvorvidt dette kan ha vært en kilde også for resistente *E. coli*, kan denne undersøkelsen ikke gi noe svar på. Det er en rekke potensielle spredningsveier for slike bakterier, og undersøkelsene omfattet ikke smittesporing. Det har tidligere vært vist at husdyrgjødsel kan være en viktig kilde til anrikning av ARG i jord [21]. Det er videre rapportert at fekal forurensing fra menneske er den viktigste kilde til høye ARG nivåer i miljøet [22],

Den høyeste forekomsten av ARG ble funnet i jordprøvene (81,8 prosent), hvor det også ble funnet en stor andel prøver med *E. coli* (70,8 prosent). Samtidig ble det bare påvist *E. coli* med fenotypisk resistens i én jordprøve. Sammenlignet med de andre prøvetypene (rødkløver, mus, snegl og meitemark) som kan defineres som individprøver, er jordprøvene samlet inn som et gjennomsnitt av et prøvetakingslokalitet. Hvorvidt dette har påvirket mengden bakterier eller ARG i prøvene kan ikke denne undersøkelsen gi noe svar på.

Ved sammenligning av påviste resistensgener i prøvematerialet og *E. coli*-isolater fra de samme prøvene, ble alle resistensgener som var funnet i isolatene også identifisert i det originale prøvematerialet. I tillegg var det flere tilfeller hvor det i én prøve ble påvist flere resistensgener i prøvematerialet enn det som ble funnet i isolatene fra samme prøve. Dette kan skyldes at det originale prøvematerialet inneholdt andre typer bakterier enn *E. coli* med andre resistensgener. Resultatene viste en sammenheng mellom høy *Sum ARG*-konsentrasjon og funn av resistente *E. coli* i prøvematerialet.

4.2 Potensielle drivere (pesticider, tungmetaller, antibiotika)

Undersøkelsen av potensielle kjemiske drivere for utvikling av antimikrobiell resistens i miljøet inkluderte analyse av pesticider, antibiotika og tungmetaller i jordprøver.

Pesticider ble som forventet påvist mest konsistent og i høyeste nivåer i jord fra lokaliteter med konvensjonell driftspraksis. Det var imidlertid enkelte høye funn også i prøver fra økologiske og ødelokaliteter, men da i områder hvor det kan ha vært påvirkning fra nærliggende konvensjonell jordbruksproduksjon. Korrelasjonsanalyser som sammenliknet pesticidkonsentrasjoner med funn og konsentrasjoner av ARG viste ingen statistisk signifikante sammenhenger. Imidlertid var dette en relativt liten studie, og mer omfattende undersøkelser er nødvendige for å kunne vurdere om enkelte pesticider kan ha en effekt.

Jordprøvene ble i 2019 samlet inn i både juni og i september, men resultater for pesticider kan ikke ut fra dette tolkes i retning av faste sesongvariasjoner. Plantevernpraksis kan omfatte sprøyting både vår, sommer og høst, men omfanget avhenger av behovet for bruk av pesticider i den enkelte produksjon det enkelte år. Værforholdene har stor innvirkning på både bruken og nedbrytningen av pesticidene og det vil være store tilfeldige variasjoner mellom år. Ugrasmiddel benyttes hovedsakelig om våren, og soppmiddel brukes gjennom sommeren (juni-august), så vi forventer å finne de høyeste konsentrasjonene av ugrasmiddel i jorda som ble prøvetatt i juni mens soppmiddel forventes å påvises i høyere konsentrasjoner i jordprøver tatt ut i september i produksjoner med sen høsting (som potet og vintergulrot). Soppmiddel påvist i jord prøvetatt i juni kan være resultat av tidlig soppsprøyting eller rester som er igjen i jorda etter behandling foregående år.

Rester av antibiotika ble ikke påvist i det utvalgte jordprøver som ble analysert, og dette var i samsvar med det som var forventet ut fra den lave bruken av antibiotika i norsk husdyrproduksjon. Prøveopparbeidingsmetoden før analyse av rester av pesticider og

antibiotika i jord var imidlertid optimalisert for rester av pesticider, så vi kan ikke se bort fra at antibiotika i lave nivåer kan ha vært til stede i jorda. En betydelig andel jordprøver fra lokaliteter med jevnlig tilførsel av husdyrgjødsel var inkludert i prøveuttaket. Den klare korrelasjonen mellom forekomst av ARG og bruk av husdyrgjødsel indikerer at nærmere undersøkelser av antibiotikaresistens i dette materialet bør prioriteres for videre studier.

Analyser av grunnstoffer inkludert tungmetaller viste ingen signifikant variasjon mellom jordprøver fra de ulike typene lokaliteter, og det kan derfor ikke trekkes noen konklusjoner ut fra våre resultater om dette er en driver for antibiotikaresistens i miljøet eller ikke.

Jordprøvetakingen i prosjektet ble gjennomført ved uttak av ti delprøver fordelt over et større areal som ble slått sammen før analyse. Oppløsningen på disse resultatene er dermed lavere enn for resultatene fra de øvrige prøvetypene. Denne metodikken ble valgt for å kunne gjennomføre kartleggingen innenfor kostnadsrammene for prosjektet. Analyse av hver enkelt delprøve fra hver lokalitet for jordprøvetaking, eventuelt delprøver tatt ut etter et annet tilfeldig eller planlagt mønster, ville kunne gi mer informasjon om potensialet for effekter av de studerte driverne samt ved hvilke nivåer en eventuell effekt vil kunne inntreffe. Publiserte undersøkelser indikerer at jordmikrober som bryter ned pesticider kan utvise egenskaper/gener knyttet både til pesticidresistens og antibiotikaresistens [4,23]. En kartlegging eller overvåking over flere år vil være nødvendig for å kunne avdekke eventuelle effekter som utvikles over tid på grunn av stadig påvirkning fra en potensiell driver, og eventuelt varigheten av en slik effekt [24].

Den relativt sett høye forekomsten av ARG i jordprøver fra jordbruksareal gjør dette til et viktig aspekt å følge opp videre i en Én-helse tilnærming hvor også jordhelse er et viktig element. Slike undersøkelser kan knyttes til mer omfattende initiativ for å få et mer helhetlig bilde som også kaster lys over driverne som påvirker forekomst av ARG i jordsystemet [2]. Det er nylig utarbeidet forslag til system for jordsmonnovervåking for dyrka mark som kan være et godt utgangspunkt for en slik kobling ([Rapport 2021](#)).

4.3 Videre studier og overvåking

I denne studien ble det undersøkt for både bakterier isolert fra prøvematerialet og resistensgener i prøvematerialet ved hjelp av en nyutviklet DNA chip. Fordelene ved å bruke isolerte bakterier er at de kan testes mot mange ulike antibiotika, man kan undersøke hvilke gener de har, og man kan måle om de faktisk uttrykker resistens. Man kan også undersøke om deres resistensgener kan overføres til andre bakterier, og om bakteriene har potensiale til å smitte mennesker og dyr. Det er vanlig å bruke *E. coli* som en indikatorbakterie, men i denne studien var det bare mulig å isolere *E. coli* fra en viss andel av prøvene. Det kunne derfor være flere resistente bakterier til stede som ikke ble oppdaget. Fordelen med den nyutviklede DNA chip-en er at man på en relativt ressurseffektiv måte kan screene alle prøvene for tilstedeværelse av et stort antall resistensgener, uavhengig av om man isolerer bakterier eller ikke. Sammenligning av de to metodene på prøver med resistente *E. coli* viste godt samsvar. Ulempene er at man ikke vet hvilke bakterier som bærer disse genene og hvilken betydning de har. Resultatene viser at kombinasjonen av disse to metodene med fordel kan brukes i videre studier og overvåking.

Undersøkelsen viste at antibiotikaresistens kan oppdages i prøver fra både planter, terrestriske dyr og jord. Både *E. coli* og *Hafnia* spp., en annen potensiell indikatorbakterie i

miljøprøver, ble funnet i relativt få individer av meitemark. Dette er tarmbakterier som også kan overføres til mennesker og andre dyr, og som derfor kan ha et potensiale til å spre antibiotikaresistens. Med tanke på å oppdage slike, synes ikke meitemark å være en optimal prøvetype. Mus var den mest ressurskrevende prøvetypen å samle inn og bearbeide, og så ikke ut til å gi mer informasjon enn de andre prøvene. Det var videre en fordel at individprøvene ikke var for små. For videre studier og overvåkning kan derfor jord, rødkløver og snegler være aktuelle prøvetyper. Andre planter som er relativt store og utbredt i landet kan også være aktuelle.

Denne studien skulle både se på forekomst av resistens i flere ulike, geografisk spredte miljøer og i minst to sesonger, noe som innebar inkludering av mange variabler. Dette kompliserte arbeidet med å se på potensielle drivere. Fremtidige studier på drivere bør være mer målrettet på den problemstillingen. Både denne og tidligere studier kan tyde på at resistens funnet i miljøet har en viss sammenheng med menneskelig aktivitet. Fremtidige studier bør derfor også se nærmere på smitteveier til og fra miljø.

5 Konklusjon

Resultatene fra denne studien understreker betydningen av å behandle antibiotikaresistens i et én helse perspektiv hvor også miljøet er inkludert.

- Antibiotikaresistente *E. coli* ble identifisert i 7,2 prosent av prøvene hvor *E. coli* ble funnet, dvs. på samme nivå som tidligere undersøkelser av norsk villfauna, og med resistens mot samme typer antibiotika som tidligere funnet i norsk villfauna, produksjonsdyr og bladgrønnsaker.
- Undersøkelse med DNA chip for 35 ulike gener knyttet til antibiotikaresistens (ARG) viste at 60 prosent av prøvene med mikrobielt DNA var positive for et eller flere ARG.
- Øde områder hadde signifikant lavere antall og relativ konsentrasjon av ARG enn landbruksarealer (økologiske og konvensjonelle felt), og ingen resistente *E. coli* ble funnet i øde områder.
- Alle unntatt én prøve med resistente *E. coli* ble funnet i prøver fra økologisk landbruk. For jordprøver var det signifikant høyere antall og relativ konsentrasjon av ARG i lokaliteter med bruk av husdyrgjødsel enn i lokaliteter uten slik bruk.
- Det ble ikke funnet antibiotika i jordprøvene.
- Det ble ikke funnet noen statistisk sammenheng mellom ARG og pesticider, når man ser bort fra en prøve der svært høy ARG - og pesticidkonsentrasjon sammenfalt.
- Det ble ikke funnet noen statistisk sammenheng mellom type jordprøve (konvensjonell, økologisk eller øde) og forekomst av ulike grunnstoffer/tungmetaller for høstprøvene fra 2019 (n=12), og det kan derfor ikke trekkes noen konklusjoner ut fra disse resultater om dette er en driver for antibiotikaresistens i miljøet eller ikke.

Resultatene viser videre at å kombinere av screening av prøver for innhold av resistensgener med identifisering og karakterisering av resistente indikatorbakterier, vil være velegnet for fremtidige studier og overvåkning av antibiotikaresistens i miljø.

6 Takk

6.1 Veterinærinstituttet

Det rettes en stor takk til Agathe Vikre Danielsen og Fiona Valerie Franklin-Alming for utmerket arbeid med resistenstesting av bakterieisolatene, og til Aina Steihaug Barstad for det gode og viktige arbeidet med pilotstudien. Videre takkes personell ved Sesjonen Mikrobiologi ved VI Oslo og Laboratoriet ved VI Trondheim for den store innsatsen som ble lagt ned i prøvemottak og -bearbeiding, og Seksjon Molekylærbiologi for rask og solid helgenomsekvensering av bakterieisolater. Takk også til Arne Holst-Jensen for gode faglige innspill til både prosjektet og denne rapporten.

6.2 NIBIO

Feltarbeidet i undersøkelsen er utført med stor presisjon og innsatsvilje av Bertinius Brattebø, Svein Selnes, Per Magnus Hansen, Samson Øpstad, Erling Fjelldal, Håvard Haustveit, Marianne Hotle, Tor Arne Bjørn, Geir Kjølberg Knudsen, Hugh Riley og Marius Bless. Takk for hurtig artsbestemmelse av mus/spissmus og snegler av henholdsvis Paul Eric Aspholm og Bjørn Arild Hatteland, og for godt laboratoriearbeid med prøver, DNA, pesticider og tungmetaller utført av Vilde Rushfeldt Beddari, Monica Fongen, Jan Erik Jacobsen, Karin Prestmoen, Katinka Lang og Monica Skogen. Ellers takk til alle andre i NIBIO som har bidratt med administrasjon og forsendelser av prøver.

En stor takk til alle bønder og grunneiere som har gitt oss tillatelse til å ta prøver, og har bidradd med opplysninger om lokalitetene.

7 Referanser

1. Høie, B., Aspaker, E., Listhaug, S., Sundtoft, T. *Regjeringens nasjonale strategi mot antibiotikaresistens for 2015-2020*; I-1164 B; Helse- og omsorgsdepartementet: 2015.
2. Singer, A.C.; Shaw, H.; Rhodes, V.; Hart, A. Review of Antimicrobial Resistance in the Environment and Its Relevance to Environmental Regulators. *Front Microbiol* **2016**, *7*, 1728, doi:10.3389/fmicb.2016.01728.
3. Liao, H.; Li, X.; Yang, Q.; Bai, Y.; Cui, P.; Wen, C.; Liu, C.; Chen, Z.; Tang, J.; Che, J., et al. Herbicide selection promotes antibiotic resistance in soil microbiomes. *Mol Biol Evol* **2021**, 10.1093/molbev/msab029, doi:10.1093/molbev/msab029.
4. Ramakrishnan, B.V., K.; Sethunathan, N.; Megharaj, M. Local applications but global implications: can pesticides drive microorganisms to develop antimicrobial resistance? *Science of The Total Environment* **2019**, *654*, 177-189.
5. D'Costa, V.M.; King, C.E.; Kalan, L.; Morar, M.; Sung, W.W.; Schwarz, C.; Froese, D.; Zazula, G.; Calmels, F.; Debruyne, R., et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* **2011**, *477*, 457-461, doi:10.1038/nature10388.
6. Ewels, P.; Magnusson, M.; Lundin, S.; Kaller, M. MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 3047-3048, doi:10.1093/bioinformatics/btw354.
7. Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2114-2120, doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
8. Bankevich, A.; Nurk, S.; Antipov, D.; Gurevich, A.A.; Dvorkin, M.; Kulikov, A.S.; Lesin, V.M.; Nikolenko, S.I.; Pham, S.; Prjibelski, A.D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* **2012**, *19*, 455-477, doi:10.1089/cmb.2012.0021.
9. Walker, B.J.; Abeel, T.; Shea, T.; Priest, M.; Abouelliel, A.; Sakthikumar, S.; Cuomo, C.A.; Zeng, Q.; Wortman, J.; Young, S.K., et al. Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS one* **2014**, *9*, e112963, doi:10.1371/journal.pone.0112963.
10. Gurevich, A.; Saveliev, V.; Vyahhi, N.; Tesler, G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 1072-1075, doi:10.1093/bioinformatics/btt086.
11. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2068-2069, doi:10.1093/bioinformatics/btu153.
12. Hunt, M.; Mather, A.E.; Sanchez-Buso, L.; Page, A.J.; Parkhill, J.; Keane, J.A.; Harris, S.R. ARIBA: rapid antimicrobial resistance genotyping directly from sequencing reads. *Microbial genomics* **2017**, *3*, e000131, doi:10.1099/mgen.0.000131.
13. Wirth, T.; Falush, D.; Lan, R.; Colles, F.; Mensa, P.; Wieler, L.H.; Karch, H.; Reeves, P.R.; Maiden, M.C.; Ochman, H., et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Molecular microbiology* **2006**, *60*, 1136-1151, doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.
14. Hasman, H.; Saputra, D.; Sicheritz-Ponten, T.; Lund, O.; Svendsen, C.A.; Frimodt-Møller, N.; Aarestrup, F.M. Rapid whole-genome sequencing for detection and characterization of microorganisms directly from clinical samples. *Journal of clinical microbiology* **2014**, *52*, 139-146, doi:10.1128/JCM.02452-13.
15. Larsen, M.V.; Cosentino, S.; Lukjancenko, O.; Saputra, D.; Rasmussen, S.; Hasman, H.; Sicheritz-Ponten, T.; Aarestrup, F.M.; Ussery, D.W.; Lund, O. Benchmarking of methods for genomic taxonomy. *Journal of clinical microbiology* **2014**, *52*, 1529-1539, doi:10.1128/JCM.02981-13.

16. Clausen, P.; Aarestrup, F.M.; Lund, O. Rapid and precise alignment of raw reads against redundant databases with KMA. *BMC Bioinformatics* **2018**, *19*, 307, doi:10.1186/s12859-018-2336-6.
17. Bortolaia, V.; Kaas, R.S.; Ruppe, E.; Roberts, M.C.; Schwarz, S.; Cattoir, V.; Philippon, A.; Allesoe, R.L.; Rebelo, A.R.; Florensa, A.F., et al. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* **2020**, *75*, 3491-3500, doi:10.1093/jac/dkaa345.
18. Zankari, E.; Allesoe, R.; Joensen, K.G.; Cavaco, L.M.; Lund, O.; Aarestrup, F.M. PointFinder: a novel web tool for WGS-based detection of antimicrobial resistance associated with chromosomal point mutations in bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother* **2017**, *72*, 2764-2768, doi:10.1093/jac/dkx217.
19. Berendonk, T.U.; Manaia, C.M.; Merlin, C.; Fatta-Kassinos, D.; Cytryn, E.; Walsh, F.; Burgmann, H.; Sorum, H.; Norstrom, M.; Pons, M.N., et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nat Rev Microbiol* **2015**, *13*, 310-317, doi:10.1038/nrmicro3439.
20. Mo, S.S.; Urdahl, A.M.; Madslie, K.; Sunde, M.; Nesse, L.L.; Slettemeas, J.S.; Norstrom, M. What does the fox say? Monitoring antimicrobial resistance in the environment using wild red foxes as an indicator. *PLoS One* **2018**, *13*, e0198019, doi:10.1371/journal.pone.0198019.
21. Xie, W.Y.; Shen, Q.; Zhao, F.J. Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *Eur J Soil Sci* **2018**, *69*, 181-195, doi:10.1111/ejss.12494.
22. Karkman, A.; Parnanen, K.; Larsson, D.G.J. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nature Communications* **2019**, *10*, doi:ARTN 80 10.1038/s41467-018-07992-3.
23. Rangasamy, K.; Athiappan, M.; Devarajan, N.; Samykannu, G.; Parray, J.A.; Aruljothi, K.N.; Shameem, N.; Alqarawi, A.A.; Hashem, A.; Abd Allah, E.F. Pesticide degrading natural multidrug resistance bacterial flora. *Microb Pathogenesis* **2018**, *114*, 304-310, doi:10.1016/j.micpath.2017.12.013.
24. Radu, E.; Woegerbauer, M.; Rab, G.; Oismuller, M.; Strauss, P.; Hufnagl, P.; Gottsberger, R.A.; Krampe, J.; Weyermaier, K.; Kreuzinger, N. Resilience of agricultural soils to antibiotic resistance genes introduced by agricultural management practices. *Science of the Total Environment* **2021**, *756*, doi:ARTN 143699 10.1016/j.scitotenv.2020.143699.

8 Appendiks

Tabell A 1: Prøvetakingsplan for hver type lokalitet i hvert av områdene i de ulike sesongene. Jordprøvene er samleprøver av ti individuelle prøver. Prøvene av planter og dyr er individuelle prøver. Vår 2019 var det mulig også samle inn meitemark hvis det ikke ble funnet nok snegler og/eller mus.

Sesong	Områder inkludert	Type lokalitet	Antall lokaliteter pr område	Antall jordprøver	Antall rødkløver	Antall snegler	Antall mus	Totalt antall prøver
Vår 2019	A, B, D, H	Økologisk	1	1	10	10	10	31
		Konvensjonell	1	1	10	10	10	31
		Øde	1	1	-	-	0	1
Høst 2019	A, B, D, H	Økologisk	1	1	10	10	10	31
		Konvensjonell	1	1	10	10	10	31
		Øde	1	1	0	0	0	1
Vår 2020	A, B, C, D, E, F, G, H, I, J	Økologisk	1	1	5	5	0	11
		Konvensjonell	1	1	5	5	0	11
		Øde	4	1	0	0	0	4

Tabell A 2: Informasjon om prøvetakingsområder og lokaliteter 2019-2020, samt antall uttatte prøver.

Område	Type lokalitet	Antall prøver vår-19	Antall prøver høst-19	Antall prøver vår-20
A	Økologisk	21	21	6
	Konvensjonell	21	25	6
	Øde	1	1	4
B	Økologisk	21	24	11
	Konvensjonell	21	31	11
	Øde	1	1	4
C	Økologisk			11
	Konvensjonell			11
	Øde			4
D	Økologisk	31	31	11
	Konvensjonell	31	31	11
	Øde	1	1	4
E	Økologisk			7
	Konvensjonell			11
	Øde			4
F	Økologisk			11
	Konvensjonell			11
	Øde			4
G	Økologisk			11
	Konvensjonell			11
	Øde			4
H	Økologisk	20	21	11
	Konvensjonell	27	30	11
	Øde	1	1	4
I	Økologisk			7
	Konvensjonell			8
	Øde			4
J	Økologisk			6
	Konvensjonell			6
	Øde			4
Sum per type lokalitet	Økologisk	93	97	92
	Konvensjonell	100	117	97
	Øde	4	4	40
SUM	Alle områder	197	218	229

Tabell A 3: Fordeling av MIC verdier for *E. coli* isolater (n=313) fra rødkløver (n=72), snegler (n=52), mus (n=138), meitemark (n=3) og jord (n=48), hvorav opp til tre isolater kan være fra samme prøve (gjennomsnitt 2,8 isolater pr prøve).

Stoff	Resistens (%) [95% KI]	Fordeling (%) of MIC verdier (mg/L)*															
		0.015	0.03	0.06	0.12	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	≥512
Tetracyklin	0.3 [0 - 1.8]								96.2	2.6	1.0			0.3			
Tigecyklin	0 [0 - 1.2]					99.7	0.3										
Kloramfenikol	4.5 [2.5 - 7.4]											87.9	7.7		0.6	3.8	
Ampicillin	4.8 [2.7- 7.8]							0.6	19.5	69.0	6.1		0.3		4.5		
Cefotaxim	0 [0 - 1.2]					100											
Ceftazidim	0 [0 - 1.2]						100										
Meropenem	0 [0 - 1.2]		100														
Trimetoprim	0.3 [0 - 1.8]											99.0	0.6				0.3
Sulfamethoxazol	0 [0 - 1.2]					39.0	53.7	7.0	0.3								
Azithromycin	** **								4.5	48.9	43.8	2.9					
Gentamicin	0 [0 - 1.2]						87.9	10.2	1.9								
Ciprofloxacin	0 [0 - 1.2]	84.3	13.7	1.9													
Nalidiksinsyre	0 [0 - 1.2]									99.7	0.3						
Colistin	0 [0 - 1.2]							83.7	16.3								

* Uthevede vertikale linjer angir epidemiologiske cut-off verdier for resistens. KI = konfidensintervall. Hvite felter angir konsentrasjonene for testing av de enkelte stoff. MIC verdier som er høyere enn den høyeste konsentrasjonen testet, er angitt som laveste verdi over testkonsentrasjonene. MIC verdier som er lik eller lavere enn laveste konsentrasjon testet, er angitt som laveste konsentrasjon testet.

** Cut-off verdi for azithromycin er ikke fastsatt.

Tabell A 4: Fordeling av MIC verdier for *Hafnia* spp. isolater (n=96) fra rødkløver (n=32), snegler (n=48), mus (n=9), meitemark (n=5) og jord (n=2), hvorav opp til tre isolater kan være fra den samme prøven (gjennomsnitt 2,0 isolater pr prøve). Cut-off verdier er ikke brukt på *Hafnia* spp.

Stoff	Fordeling (%) of MIC verdier (mg/L)*															
	0.015	0.03	0.06	0.015	0.25	0.5	0.015	2	4	0.015	16	32	0.015	128	256	0.015
Tetracyklin								4.2	32.3	61.5	2.1					
Tigecyklin					42.7	53.1	3.1	1.0								
Kloramfenikol										58.3	40.6	1.0				
Ampicillin								6.2	32.3	27.1	20.8	10.4	2.1	1.0		
Cefotaxim					80.1	17.7	2.1									
Ceftazidim						46.9	40.6	10.4	2.1							
Meropenem		99.0	1.0													
Trimetoprim										92.7	7.3					
Sulfamethoxazol					6.2	6.2	34.4	40.6	12.5							
Azithromycin									1.0	5.2	54.2	38.5		1.0		
Gentamicin						100										
Ciprofloxacin	94.8	3.1	2.1													
Nalidiksinsyre									100							
Colistin							1.0			62.5	28.1	8.3				

Hvite felter angir konsentrasjonene for testing av de enkelte stoff. MIC verdier som er høyere enn den høyeste konsentrasjonen testet, er angitt som laveste verdi over testkonsentrasjonene. MIC verdier som er lik eller lavere enn laveste konsentrasjon testet, er angitt som laveste konsentrasjon testet.

Tabell A 5: Sammenligning av resultater fra DNA-chip for ARG påvist i originalt prøvemateriale og *E.coli*-isolater. Verdier for 16S er angitt som ng/ μ L, mens verdier for ARG er angitt som ARG/16S. Verdier merket i grønt er bekreftet ved helgenomsekvensering av isolatene.

Prøve-nummer	Type	16S	int11	blaTEM	catA	strA	strB	sul2	tetA	tetB	tetM	Sum ARG	Antall ARG
2019-01-3544-20	Originalt prøvemateriale	0,683	0,000	5,639	8,351	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	14,006	3*
2019-01-3544-20-1	<i>E. coli</i> isolat	0,615	0,000	5,852	8,162	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	14,014	2
2019-01-3544-20-2	<i>E. coli</i> isolat	0,862	0,000	4,634	6,639	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	11,273	2
2019-01-3544-9	Originalt prøvemateriale	0,655	0,000	3,755	3,965	0,000	0,000	0,018	0,000	0,000	0,151	7,956	5*
2019-01-3544-9-2	<i>E. coli</i> isolat	0,756	0,000	4,918	7,170	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	12,090	3
2019-01-3544-9-1	<i>E. coli</i> isolat	0,553	0,000	6,084	8,922	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	15,007	2
2019-01-3544-5	Originalt prøvemateriale	0,733	0,000	3,779	4,458	2,161	2,067	3,119	0,000	2,263	0,000	17,864	7*
2019-01-3544-5-2	<i>E. coli</i> isolat	0,695	0,000	5,415	8,079	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	13,494	2
2019-01-3544-5-1	<i>E. coli</i> isolat	0,562	0,000	6,762	9,916	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	16,678	2
2019-01-3544-3	Originalt prøvemateriale	0,744	0,000	2,428	2,720	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	5,194	4*
2019-01-3544-3-1	<i>E. coli</i> isolat	0,854	0,000	4,529	6,690	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	11,224	3*
2019-01-3544-3-2	<i>E. coli</i> isolat	1,068	0,000	3,177	4,534	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	7,711	2
2019-01-3942-4	Originalt prøvemateriale	0,507	0,000	0,762	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,762	1
2019-01-3942-4-3	<i>E. coli</i> isolat	1,027	0,000	3,643	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	3,860	5*
2019-60-1860-20	Originalt prøvemateriale	0,922	1,965	3,681	0,000	2,236	2,141	2,465	1,547	0,000	0,023	14,089	8
2019-60-1860-20-2	<i>E. coli</i> isolat	0,455	4,904	6,269	0,000	5,258	8,977	5,644	3,145	0,000	0,000	34,197	6

* ARG påvist med konsentrasjoner <0,1 ARG/16S er ikke tatt med i oversikt, men er medberegnet i Sum ARG og Antall ARG.

Tabell A 6: Prøver fra 2019 og 2020 som hadde en Sum ARG-konsentrasjon over 5 ARG/16S. Verdier for 16S er angitt som ng/ μ L, mens verdier for ARG er angitt som ARG/16S. AGR uten treff på noen av prøvene er ikke med i denne tabellen.

Eksternt prøvenummer	Område	Lokalitet*	Prøve-materiale	År	Sesong	16S_1	intl1	AAC6	ACC3	ant3	aph3	bla ACT	bla DHA	bla SHV	bla TEM	catA	dfrA	ermB	floR	oqxA	oqxB	qnrB1
2019-01-3544-3	A	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0,74	0	0	0	0	0	0	0	0	2,43	2,72	0	0	0	0	0	0,01
2019-01-3544-5	A	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0,73	0	0	0	0	0	0	0	0	3,78	4,46	0	0	0	0	0	0,02
2019-01-3544-9	A	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0,65	0	0	0	0	0,07	0	0	0	3,76	3,97	0	0	0	0	0	0
2019-01-3544-20	A	Øko	Snegl	2019	Høst	0,68	0	0	0	0	0	0	0	0	5,64	8,35	0,02	0	0	0	0	0
2019-01-3820-11	D	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0,59	0	0	0	0	1,36	0	0	0	0	0,09	0	0	0	0	0	0
2019-01-3299-4	H	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0,35	0	0	0	0	0	0,46	0,18	0,88	0	0	0	0	0	1,72	2,04	0
2019-01-3299-5	H	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0,32	0	0	0	0	0	0	0	1,03	0	0	0,05	0	0	2,21	2,38	0
2019-01-3299-11	H	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0,45	0	0	0	0	0	1,20	0	0,73	0	0	0	0	0	1,41	1,72	0
2019-01-3299-15	H	Øko	Snegl	2019	Høst	0,24	0,16	0	0	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-01-3299-18	H	Øko	Snegl	2019	Høst	0,30	0	0	0	0	0	0,87	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-01-3305-13	H	Kon	Snegl	2019	Høst	0,12	2,17	0	0	1,34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2019-60-1860-20	D	Øko	Snegl	2019	Vår	0,92	1,97	0	0	0,03	0	0	0	0	3,68	0	0	0	0	0	0	0
2019-60-1860-26	D	Øko	Rødkløver	2019	Vår	0,15	0	0	1,26	0	0	0	0	0	0	0	0,08	0	0	0	0	0
2019-60-1861-31	D	Kon	Jord	2019	Vår	0,04	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,06	0	0	0	0
1	C	Øko	Snegl	2020	Vår	0,25	0	0	0	0	0	0	0	0	4,57	0	0	0	0	0	0	0
8	C	Kon	Snegl	2020	Vår	0,15	0	0	0	0	0	0	0	0	2,74	0	0	0	0	0	0	0
30	B	Øko	Snegl	2020	Vår	0,21	0	0	0	0	0,12	0,21	0	0	4,08	0	0	0,01	0	0,15	0,28	0
33	B	Kon	Snegl	2020	Vår	0,25	0,81	0	0	0,19	0,32	0	0	0	17,3	0	0,09	0	0	0	0	0
37	B	Øko	Rødkløver	2020	Vår	0,36	0,08	0	0	0	0	0	0	0,26	0	0	0	0	0	4,92	3,48	0
38	B	Øko	Rødkløver	2020	Vår	0,88	0	0	0	0	0	0	0	0,13	0	0	0	0	0	2,78	1,96	0
39	B	Øko	Rødkløver	2020	Vår	0,41	0	0	0	0	0	0,53	0	0,20	0	0	0	0	0	2,85	2,92	0
74	D	Kon	Jord	2020	Vår	0,09	13,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
204	F	Kon	Jord	2020	Vår	0,20	0	1,39	0	0	0	0,60	0,12	0	0,10	0	0	0	0	0	0	0,32
255	J	Øko	Jord	2020	Vår	0,57	0,30	0	0	0,31	0	0	0	0	0,72	0	0	0	0,04	0	0	0,04

Tabell A 6 forts.

Eksternt prøvenummer	Område	Lokalitet	Prøvemateriale	År	Sesong	strA	strB	sul1	sul2	tetA	tetB	tetM	Sum ARG conc	Antall treff
2019-01-3544-3	A	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0	0	0	0	0	0	0	5,16	3
2019-01-3544-5	A	Øko	Rødkløver	2019	Høst	2,16	2,07	0	3,12	0	2,26	0	17,86	7
2019-01-3544-9	A	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0	0	0	0,02	0	0	0,15	7,96	5
2019-01-3544-20	A	Øko	Snegl	2019	Høst	0	0	0	0	0	0	0	14,01	3
2019-01-3820-11	D	Øko	Rødkløver	2019	Høst	1,43	2,12	0	0	0	0	0,17	5,17	5
2019-01-3299-4	H	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0	0	0	0	0	0	0	5,27	5
2019-01-3299-5	H	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0	0	0	0	0	0	0	5,67	4
2019-01-3299-11	H	Øko	Rødkløver	2019	Høst	0	0	0	0	0	0	0	5,07	4
2019-01-3299-15	H	Øko	Snegl	2019	Høst	1,65	2,09	0,17	1,66	0	0	0	5,76	6
2019-01-3299-18	H	Øko	Snegl	2019	Høst	4,79	5,53	0	0	0	0	0	11,22	4
2019-01-3305-13	H	Kon	Snegl	2019	Høst	0	0	1,67	0	0	0	0	5,18	3
2019-60-1860-20	D	Øko	Snegl	2019	Vår	2,24	2,14	0	2,46	1,55	0	0,02	14,09	8
2019-60-1860-26	D	Øko	Rødkløver	2019	Vår	1,64	2,29	0	0	0	0	0	5,28	4
2019-60-1861-31	D	Kon	Jord	2019	Vår	0	0	0	0	0	0	7,70	7,76	2
1	C	Øko	Snegl	2020	Vår	3,61	8,21	0	3,90	0	0	0	20,29	4
8	C	Kon	Snegl	2020	Vår	1,53	0	0	1,08	0	0	0	5,34	3
30	B	Øko	Snegl	2020	Vår	0	0	0	0	0	0	1,94	6,79	7
33	B	Kon	Snegl	2020	Vår	11,4	9,82	0	18,6	0	0,22	0	58,78	9
37	B	Øko	Rødkløver	2020	Vår	0	0	0	0	0	0	0	8,74	4
38	B	Øko	Rødkløver	2020	Vår	0	0	0	0	0	0,23	0	5,10	4
39	B	Øko	Rødkløver	2020	Vår	0	0	0	0	0	0	0,04	6,55	5
74	D	Kon	Jord	2020	Vår	0	0	0	0	0	0	1,14	14,65	2
204	F	Kon	Jord	2020	Vår	0	0,26	0	0	0	2,09	0,25	5,13	8
255	J	Øko	Jord	2020	Vår	1,11	2,31	0,13	0,32	0,10	0,19	0,38	5,95	12

Tabell A 7: Grunnstoffanalyse av jordprøver tatt ut i felt med konvensjonell og økologisk produksjon samt i øde områder høst 2019. Resultatene er gitt som gjennomsnitt ± standardavvik i mg/kg. N=4.

Grunnstoff	Konvensjonell	Økologisk	Øde
Al	25062 ± 6097	20461 ± 5992	16936 ± 11964
As	4,65 ± 1,658	3,325 ± 1,269	2,325 ± 0,675
B	7,35 ± 5,48	6 ± 4,93	6,7 ± 4,21
Ba	172,1 ± 92,3	141,3 ± 72,1	138,3 ± 136,5
Be	0,95 ± 0,311	0,825 ± 0,15	0,65 ± 0,265
Ca	6888 ± 1727	8964 ± 7552	8617 ± 4386
Cd	1,725 ± 0,206	1,575 ± 0,427	1,375 ± 0,512
Co	8,78 ± 3,99	6,6 ± 1,523	5,63 ± 3,59
Cr	38,7 ± 19,42	28,43 ± 11,92	27,9 ± 25
Cu	16,88 ± 3,57	15,3 ± 3,32	14,9 ± 4,34
Fe	25615 ± 3421	22574 ± 7051	19327 ± 10365
Ga	10,2 ± 1,003	8,75 ± 3,1	7,9 ± 4,25
K	6559 ± 2403	4810 ± 1457	3776 ± 2209
Li	20,63 ± 9,85	14,37 ± 6,62	10,9 ± 9,96
Mg	6026 ± 2304	4564 ± 1068	4172 ± 2965
Mn	476,3 ± 162,4	500,5 ± 156,3	367 ± 311
Mo	0,4 ± 0	0,4 ± 0	0,7 ± 0,6
Na	405 ± 149,5	336,8 ± 83,9	415 ± 108,6
Ni	20,18 ± 15,34	12,77 ± 8,83	13,08 ± 13,75
P	1113 ± 303	1391 ± 215	1075,3 ± 64,4
Pb	13,28 ± 2,44	12,15 ± 3,55	17,5 ± 3,63
S	458 ± 289	326,2 ± 76	1296 ± 1469
Sc	6,7 ± 1,013	5,6 ± 1,08	5,55 ± 4,43
Se	2,2 ± 0	2,2 ± 0	2,2 ± 0
Sr	74,1 ± 5,82	82,1 ± 44,4	79,3 ± 31,8
Ti	216,8 ± 40,7	248 ± 72,7	237,8 ± 35,6
V	53,5 ± 18,15	40,52 ± 9,04	40,2 ± 28,3
Y	19,63 ± 2,98	18,05 ± 2,84	14,3 ± 9,3
Zn	65,95 ± 10,18	77 ± 20,9	48,3 ± 28

Tabell A 8: Pesticider påvist i jordprøver (0-5 cm jordsjikt) fra områder med konvensjonell korndyrking i Viken og Innlandet i 2019. Alle konsentrasjoner er angitt i mikrogram pr kg tørr jord (μg plantevernmiddel/kg tørr jord). F = soppmiddel (fungicid), H = ugrasmiddel (herbicid), I = skadedyrmiddel (insecticid), M = metabolitt.

Plantevernmiddel	Type	Viken (juni)	Viken (september)	Innlandet (juni)	Innlandet (september)
Propiconazole	F	36,81	11,37		
Proquinazid	F	6,86			
Fludioxonil	F	6,3	0,20	0,22	0,20
Difenoconazole	F	5,31			
Prochloraz	F	3,05	12,1	1,7	1,64
Bixafen	F	2,57	0,82		
Imazalil	F	1,21	0,90		
Triticonazole	F	1,16	4,37		
Fenpropidin	F	0,77	0,75		
Azoxystrobin	F	0,42	0,25	0,36	0,50
Pyraclostrobin	F	0,31		0,42	0,30
Mandipropamid	F			5,82	3,33
Cyazofamid	F			0,38	0,28
Trifloxystrobin	F				1,05
Fluroxypyr	H	20,85			
Prosulfocarb	H	11,39	0,18		
Diflufenican	H	8,05	13,1		
Tribenuron-methyl	H		0,21	0,24	
Metribuzin	H			0,42	0,28
Proquinazidmet. IN-MM671	M	2,38			
Tribenuronmet. IN-L5296	M	1,41	0,42		0,35
Prothioconazole-desthio	M	1,35	5,02	0,62	7,1
Trifloxystrobinmet. CGA321113	M	1,33	1,16	0,87	16,46
Fluroxypyr-meptyl	M	1,26	0,51	0,63	0,44
Thiaclopridmet. M02	M	0,41	1,5		
Tribenuronmet. IN-A4098	M	0,37	1,2	0,37	
Metribuzinmet. DA	M			0,41	0,38
Sum pesticider		113,6	54,1	12,7	32,5

Tabell A 9: Pesticider påvist i jordprøver (0-5 cm jordsjikt) fra områder med konvensjonell gulrotproduksjon i Rogaland og Nordland i 2019. Alle konsentrasjoner er angitt i mikrogram pr kg tørr jord (μg pesticid/kg tørr jord). F = soppmiddel (fungicid), H = ugrasmiddel (herbicid), I = skadedyrmiddel (insecticid), M = metabolitt.

Plantevernmiddel	Type	Rogaland (Juni)	Rogaland (september)	Nordland (juni)	Nordland (september)
Boscalid	F	18,78	259,56	21,08	156,68
Pyraclostrobin	F	0,96	23,22	0,58	13,58
Mandipropamid	F	1,37	0,80		
Fludioxonil	F	0,26	0,25		0,31
Pencycuron	F	0,19	0,17		
Clomazone	H	21,84	0,83	81,84	0,66
Metribuzin	H	14,68	0,36	25,59	0,56
Linuron	H	0,41	0,40	3,29	1,35
Prosulfocarb	H			0,23	0,14
Lambda-cyhalothrin	I			5,52	1,88
Diazinon	I			0,83	0,61
Metribuzinmet. DA	M	1,66	0,43	3,73	0,52
Pyraclostrobinmet.	M	1,28	5,18		3,15
Pyridatmet. pyridafol	M	0,77	0,49		
Sum pesticider		62	292	147	179

Tabell A 10: Pesticider påvist i jordprøver (0-5 cm jordsjikt) fra områder med konvensjonell produksjon i 2020. Alle konsentrasjoner er angitt i mikrogram pr kg tørr jord (μg pesticid/kg tørr jord). F = soppmiddel (fungicid), H = ugrasmiddel (herbicid), I = skadedyrmiddel (insecticid), M = metabolitt.

Plantevernmiddel	Type	Rogaland	Viken	Innlandet	Vestland	Nordland
Boscalid	F	4,94			102,61	45,97
Fenhexamid	F	73,46				
Fenpropimorf	F		0,74			
Fluopyram	F	66,57				
Mandipropamid	F				0,90	
Penconazole	F	90,55				
Pencycuron	F				44,79	
Prochloraz	F		8,11			
Pyraclostrobin	F				5,08	1,47
Pyrimetanil	F	33,56				

Trifloxystrobin	F		7,24			
Triticonazole	F		3,50			
Clomazone	H				0,56	0,54
Diflufenican	H		76,08			
Isoxaben	H	1,13				
Linuron	H					2,00
Metribuzin	H					49,21
Indoxacarb	I	55,26				
Lambda-cyhalothrin	I					20,82
Spirodiclofen	I		3,62			
Spirotetramat	I	8,48				
Thiacloprid	I	1,20				
Boscalidmet. M510F49	M				1,07	0,59
Cyprodinil-met. CGA249287	M					
Fluopyram-7-OH	M	2,73				
Metribuzin-DA	M					2,83
Metsulfuron met. INA4098	M		1,32			
Prochloraz met. BTS44595	M		5,32			
Prothioconazole-desthio	M		51,90			
Pyracl.met.BF500-3	M		1,23		0,61	
Pyracl.met.BF500-6	M				8,18	
Pyridatmet. Pyridafol	M				1,03	
Spirotetramat-enol	M	3,77				
Spirotetramat-ketohydroxy	M	33,19				
Thiacloprid-amid	M	5,60				
Tribenuron met. INL5296	M		1,13			
Trifloxystrobin acid	M		10,68			
Sum pesticid		380,4	170,9	n.d.*	164,8	123,4

*På denne lokaliteten var det funn i jordprøve fra areal med økologisk korndyrking (sum pesticider påvist 50,7 µg/k

Frisk fisk



Sunne dyr



Trygg mat



Faglig ambisiøs, fremtidsrettet og samspillende - for én helse!



Veterinærinstituttet
— Norwegian Veterinary Institute

Oslo

Trondheim

Sandnes

Bergen

Harstad

Tromsø

postmottak@vetinst.no
www.vetinst.no