

Slamspridning och antibiotikaresistens

Utvärdering av risker kopplade till långvarig slamspridning på åkermark

C Rutgersson
S Ebmeyer
S.B Lassen
A Karkman
J Fick
E Kristiansson
K.K Brandt
C-F Flach
D.G.J Larsson

Svenskt Vatten

UTVECKLING

Svenskt Vatten Utveckling (SVU) är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området.

Författarna är ensamt ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan åberopas såsom representerande Svenskt Vattens ståndpunkt.

Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten AB

POSTADRESS BOX 14057, 167 14 Bromma

BESÖKSADRESS Gustavslundsvägen 12, 167 51 Bromma

TELEFON 08-506 002 00

E-MAIL svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se

RAPPORTENS TITEL	Slamspridning och antibiotikaresistens Utvärdering av risker kopplade till långvarig slamspridning på åkermark
TITLE OF THE REPORT	Application of sewage sludge and antibiotic resistance – evaluation of risks associated with long-term application on farmland
FÖRFATTARE	C Rutgersson, ^{a,b} S Ebmeyer, ^{a,b} S.B Lassen, ^{c,d} A Karkmana, ^{b,e} J Fick, ^f E Kristiansson, ^{a,g} K.K Brandt, ^c C-F Flach, ^{a,b} D.G.J Larsson, ^{a,b} ^a Centrum för antibiotikaresistensforskning (CARE) vid Göteborgs Universitet. ^b Avd. för infektionssjukdomar, Inst. för biomedicin, Sahlgrenska Akademin vid Göteborgs Universitet. ^c Avd. för växt- och miljövetenskap, Köpenhamns Universitet. ^d Kinesiskt-Danskt centrum för utbildning och forskning, Universitetet för kinesiska forskningsakademin, Beijing. ^e Avd. för mikrobiologi, Helsingfors Universitet. ^f Avd. för kemi, Umeå Universitet. ^g Avd. för matematiska vetenskaper, Chalmers tekniska högskola.
RAPPORTNUMMER	2020-11
ANTAL SIDOR	32
SAMMANDRAG	Hur påverkas odlingsmark vid långvarig spridning av avloppsslam när det gäller förekomst av antibiotika, andra antimikrobiella ämnen, resistent bakterier och resistensgener? Studien visar att användning av avloppsslam på det sätt vi gör i Sverige inte verkar medföra några uppenbara risker för utveckling av antibiotikaresistens.
ABSTRACT	This study investigates how long-term application of Swedish sewage sludge on farmlands affects the presence of antibiotic residues, other antimicrobial compounds, antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes, as well as the overall composition of bacteria within the soil. The results does not indicate any clear risk related to antibiotic resistance development under the conditions described.
SÖKORD	Slamspridning, antibiotika, antibiotikaresistens, biocider, jord, bakterier
KEYWORDS	Sewage sludge, antibiotics, antibiotic resistance, biocides, soil, bacteria
MÅLGRUPPER	Forskare, myndigheter, reningsverks-sektorn, jordbrukssektorn,
RAPPORT	Finns att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
UTGIVNINGÅR	2020
UTGIVARE	© Svenskt Vatten AB

Om projektet

PROJEKTNUMMER 17-113

PROJEKTETS NAMN Slamspridning på åkermark – långsiktiga effekter på jord och gröda, samt förekomst av antibiotikaresistenta bakterier

PROJEKTETS FINANSIERING Svenskt Vatten Utveckling, Göteborgs Universitet, Vetenskapsrådet, Formas

GRAFISK FORM Bertil Örtenstrand, Ordförandet AB

ORIGINALPUBLIKATION Denna rapport är en svensk sammanfattning av en längre engelskspråkig expertgranskad, vetenskaplig publikation av samma författare publicerad i tidskriften Environment International, 2020 vol 137, 105339 DOI:<https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105339>: Long-term application of Swedish sewage sludge on farmland does not cause clear changes in the soil bacterial resistome. Återpublicering av figurer och tabeller från originalpublikationen har gjorts med tillstånd av Elsevier.

Förord

Projektet ”Slamspridning på åkermark” startades 1981 och är unikt – inte bara i Sverige utan även i Europa – genom att det är upplagt som ett praktiskt fältförsök, där växtföljden väljs av lantbrukaren, och genom att slamtillförselns påverkan på åkermarken kunnat följas under lång tid. Med fältförsöken som bas har genom åren ett antal specialstudier genomförts. De mest aktuella gäller mikroplaster (Ljung et al., 2018), respektive antibiotikaresistens, som är ämnet för denna rapport.

Det finns ett uppenbart värde i att återföra näring till jordbruket och därmed sluta kretsloppet. Reningsverken och slammet som produceras där är samtidigt en uppsamlingspunkt för många av de kemikalier vi använder i samhället. Rester av den antibiotika vi åter hamnar tillsammans med resistenta tarmbakterier i slammet vid våra reningsverk. Därför har det länge funnits en oro för att spridning av rötslam på åkermark bidrar till att antibiotikaresistens ska utvecklas eller spridas.

I denna studie kvantifierades halter av antibiotika och andra antibakteriella ämnen i slam och jord, resistensgener, resistenta bakterier liksom vilka arter av bakterier som fanns i jordarna. En övergripande sammanfattning av resultaten är att nästan allt som studerats ser ungefär likadant ut i jordar där man spridit mycket slam, lite slam, inget slam eller bara spridit oorganiskt gödningsmedel. Det fanns inga tecken på att varken antibiotika eller resistenta bakterier ansamlas i jorden över tid. Näringstillförseln har en viss påverkan på vilka bakteriearter som trivs bäst i jorden, vilket i sig inte innebär någon risk. Mängden biotillgänglig koppar ökade också något med ökad slamgiva, men inte till nivåer som bedöms utgöra någon risk för selektion av resistens. Konklusionen från studien är att om det finns effekter på resistensförekomst så är dessa mycket små. Att sprida rötslam på åkermark i den omfattning och på det sätt man gör i Sverige i dag verkar därför inte medföra någon uppenbar risk för att driva på resistensutvecklingen. En mer utförlig beskrivning av studien finns att läsa på engelska, publicerad i tidskriften *Environment International* (Rutgersson et al., 2020).

Författarna vill tacka personal på Hushållningssällskapet Skåne för tillgång till fältförsöksområdet och hjälp med provtagning av jord och rötat slam. Personal på Sjölanda avloppsreningsverk i Malmö tackas för hjälp med provtagning av stickprover på slam under rötningsprocessen.

Projektet ”Slamspridning på åkermark” finansieras av kommunerna Burlöv, Kävlinge, Lund, Lomma, Malmö, Staffanstorps, Svedala och Trelleborg, samt SYSAV och Svenskt Vatten Utveckling. Hushållningssällskapet Skåne projektleder och ansvarar för fältförsöken.

Denna studie, om jordbakteriers resistensmönster, finansierades av forskningsanslag från Svenskt Vatten Utveckling, Formas och Vetenskapsrådet.

Juni 2020

Carolin Rutgersson och Joakim Larsson

Innehåll

Förord.....	3
Innehåll	5
Sammanfattning	6
Summary	7
Centrala begrepp och förkortningar	8
1 Introduktion	9
2 Material och metoder	10
2.1 Provtagning	10
2.2 Kemisk analys.....	11
2.3 Bioreporteranalys av biotillgängligt Cu och Zn	11
2.4 Metagenomsekvensering	12
2.5 Bakteriedling	12
2.6 Statistiska modeller	12
3 Resultat	14
3.1 Antimikrobiella koncentrationer i slam och jord	14
3.2 Cu och Zn biotillgänglighet i jord	14
3.3 ARG, MRG, BRG, MGE och CrAssphage.....	15
3.4 Bakteriesammansättning.....	15
3.5 Odlingsdata	17
4 Diskussion	20
Referenser.....	24

Sammanfattning

Hur påverkas odlingsmark vid långvarig spridning av avloppsslam när det gäller förekomst av antibiotika, andra antimikrobiella ämnen, resistenta bakterier och resistensgener? Studien visar att användning av avloppsslam på det sätt vi gör i Sverige inte verkar medföra några uppenbara risker för utveckling av antibiotikaresistens.

Genom att tillföra avloppsslam på odlingsmark tar man tillvara näringsämnen som är viktiga för grödor och minskar behovet av mineralgödsel. Samtidigt riskerar människor att exponeras för föroreningar i det slam som sprids. Det kan exempelvis handla om rester av den antibiotika vi äter som tillsammans med resistenta tarmbakterier hamnar i slammet vid reningsverken. Därför har det länge funnits oro för att slamspridning på åkermark kan bidra till att antibiotikaresistens utvecklas eller sprids.

För att bedöma riskerna med spridning av antibiotikaresistens vid slamanvändning fick forskarna tillgång till ett fältforskningsprojekt i Skåne där behandlat avloppsslam har spridits på åkermark vart fjärde år sedan 1981. De tog prover på jord från försöksytorna, och de samlade in slamprover från det lokala avloppsreningsverket (orötat, halvrotat, samt rotat och långtidslagrat slam). Koncentrationen av 15 utvalda antibiotika och ett desinfektionsmedel analyserades i jord och slam, och den biotillgängliga koncentrationen av koppar och zink bestämdes i jordproverna före och efter den senaste slamgivan. Mikrobiella effekter studerades dels genom att bakterier odlades på klassiskt vis på laboratorium, dels genom att DNA-sekvenser analyserades.

Forskarna hittade inga tydliga tecken på att antimikrobiella substanser ackumulerades i jord som behandlats med rotat och långtidslagrat avloppsslam, vare sig på kort eller på lång sikt. Nivåerna av antibiotikaresistenta bakterier eller resistensgener var inte heller högre i slambehandlade jordar än i kontrollproven.

Nästan allt som studerades såg ungefär likadant ut i jordar där man hade spridit mycket slam, lite slam, inget slam eller bara spridit mineralgödsel. Näringstillförseln påverkar i viss mån vilka bakteriearter som trivs bäst i jorden, men det innebär i sig ingen risk. Mängden biotillgänglig koppar ökade något med ökad slamgiva, men inte till nivåer som bedöms utgöra någon risk för resistensutveckling.

Slutsatsen från studien är att om det finns effekter på resistensförekomst så är de mycket små. Att sprida rötslam på åkermark i den omfattning och på det sätt vi gör i Sverige i dag verkar inte medföra någon uppenbar risk att driva på resistensutvecklingen. Det är inte säkert att resultaten kan tillämpas i delar av världen där slam sprids på annat sätt. Antibiotikakoncentrationer och resistensnivåer i slam är sannolikt högre i regioner med högre antibiotikakonsumtion och en allvarigare resistenssituation än i Sverige.

Rapporten är en svensk sammanfattning av en vetenskaplig publikation på engelska av samma författare, publicerad i tidskriften *Environment International* (Rutgersson et al., 2020).

Summary

The widespread practice of applying sewage sludge to arable land makes use of nutrients indispensable for crops and reduces the need for inorganic fertilizer, however this application also provides a potential route for human exposure to chemical contaminants and microbial pathogens in the sludge.

A recent concern is that such practice could promote environmental selection and dissemination of antibiotic resistant bacteria or resistance genes. Understanding the risks of sludge amendment in relation to antibiotic resistance development is important for sustainable agriculture, waste treatment and infectious disease management. To assess such risks, we took advantage of an agricultural field trial in southern Sweden, where land used for growing different crops has been amended with sludge every four years since 1981. We sampled raw, semi-digested and digested and stored sludge together with soils from the experimental plots before and two weeks after the most recent amendment in 2017. Levels of selected antimicrobials and bioavailable metals were determined and microbial effects were evaluated using both culture-independent metagenome sequencing and conventional culturing. Antimicrobials or bioavailable metals (Cu and Zn) did not accumulate to levels of concern for environmental selection of antibiotic resistance, and no coherent signs, neither on short or long time scales, of enrichment of antibiotic resistant bacteria or resistance genes were found in soils amended with digested and stored sewage sludge in doses up to 12 metric tons per hectare. Likewise, only very few and slight differences in microbial community composition were observed after sludge amendment. Taken together, the current study does not indicate risks of sludge amendment related to antibiotic resistance development under the given conditions. Extrapolations should however be done with care as sludge quality and application practices vary between regions. Hence, the antibiotic concentrations and resistance load of the sludge are likely to be higher in regions with larger antibiotic consumption and resistance burden than Sweden.

Note: This is a direct copy of the abstract from the original publication by Rutgersson C, Ebmeyer S, Lassen SB, Karkman A, Fick J, Kristiansson K, Brandt KK, Flach C-F, Larsson DGJ. (2020). Long-term application of Swedish sewage sludge on farmland does not cause clear changes in the soil bacterial resistome. *Environment International*. 137:105339 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105339>

Centrala begrepp och förkortningar

ARB: antibiotikaresistent(a) bakterie(r)

ARG: antibiotikaresistens-gen(er)

ARV: avloppsreningsverk

Bioreporter: bakterie som modifierats genetiskt för att uttrycka en mätbar signal när ett visst ämne finns närvarande. I denna studie använde vi bioreportrar för att mäta koncentrationen av biotillgängligt koppar och zink.

BRG: biocidresistensgen(er)

CFU: colony forming units. Antalet bakteriekolonier som växer på ett visst medium, anges ofta per ml eller per g.

CTAC: cetyltrimetylammonium-klorid, används t ex i många sköljmedel

ECC: en typ av agarplatta för bakterieodling som gör det möjligt att urskilja E. coli-bakterier och andra koliforma bakterier.

FC: faldighetsförändring från engelskans "fold-change". T ex betyder FC=2 en dubblering.

Fdr: från engelskans "false discovery rate", anger proportionen av förväntade falskt positiva utfall

Ko-selektion: process där exponering för till exempel ett antibiotikum eller en metall kan leda till en ökad förekomst av flera olika typer av resistensgener på grund av att de sitter i samma genetiska kontext, till exempel på en plasmid (cirkulär DNA bit som ofta kan hoppa mellan bakterier).

LC-MS/MS: liquid chromatography tandem mass spectrometry, avancerad kemisk analysmetod som användes för att mäta koncentrationen av antibiotika och andra antimikrobiella ämnen i jord och slamprover.

MGE: mobila eller mobiliserande genetiska element, d v s gener som kan förändra sin genetiska kontext genom att flytta på sig själva eller andra gener inom ett genom eller mellan celler.

MIC: minimal inhibitory concentration, d v s den lägsta koncentration av en antimikrobiell substans som krävs för att helt inhibera tillväxten av bakterie.

MRG: metallresistensgen(er)

Selektion: urvalsprocess. I denna kontext att bakterier som bär på resistensgen får en fördel gentemot bakterier som saknar genen, till exempel vid antibiotika-exponering då icke-resistenta bakterier inhiberas eller dör vilket skapar utrymme för resistenta bakterier att tillväxa och föröka sig.

R2A: en typ av agarplatta för bakterieodling som många olika arter kan växa på.

1 Introduktion

Avloppsslam innehåller betydande mängder näringsämnen som är oumbärliga för grödor vilket motiverar dess användning som gödningsmedel för odling på åkermark i enlighet med principerna för cirkulär ekonomi. Historiskt sett har toppargumentet mot att använda slam som gödsel varit risken för ackumulering av tungmetaller i jord eller skördeprodukter (McBride, 2003) men på senare år har det också väckts en oro om att slamspridning på odlingsmark kan främja selektion och spridning av antibiotika-resistenta bakterier (ARB) eller antibiotikaresistens-gener (ARG) (Bondarczuk et al., 2016). Läkemedel som inte bryts ner i människokroppen hamnar så småningom i vårt avloppsvatten där det också finns höga koncentrationer av bakterier av olika ursprung, inklusive humana tarmbakterier som ofta bär på resistensgener (van Schaik, 2015). Avloppsreningsverk (ARV) anses därför ha en nyckelroll när det gäller utsläpp av både antibiotika och andra potentiellt selektiva ämnen samt både ARB och ARG till miljön (Rizzo et al., 2013). I vilken grad selektion för antibiotikaresistens äger rum i vattendrag eller i jord där renat avloppsvatten och slam hamnar är ännu inte fullständigt klarlagt. I Petersborg strax utanför Malmö pågår ett storskaligt forskningsprojekt där rötat slam från det kommunala reningsverket, mineralgödsel eller en kombination av de två har spridits på åkermark vart fjärde år sedan 1981 (Andersson, 2015). I denna studie analyserades koncentrationen av 15 utvalda antibiotika och en antibakteriell biocid i slam och i jordprover före och efter slamgivan 2017. Eftersom vissa metaller har en så kallad ko-selektiv effekt på antibiotikaresistens-gener mätte vi också den biotillgängliga koncentrationen av koppar (Cu) och zink (Zn) i jordprover. Förändringar i genförekomst studerades genom metagenomik, vilket innebär att DNA-fragment från väldigt många organismer i ett komplext prov sekvenseras. Genom att jämföra sekvenserna mellan olika prover studerade vi skillnader i bakteriesammansättning samt om förekomsten av resistensgener för antibiotika (ARG), metaller (MRG) och biocider (BRG) varierade mellan jordar som fått olika typer av gödning eller mellan provtagningstidpunkter. Dessutom studerades förekomsten av mobila och mobiliserande genetiska element (MGE) vilka påverkar risken för spridning av resistensgener. Vi använde också metagenomik för att studera potentiella förändringar i bakteriesammansättning. Slutligen användes metagenom-datan till att undersöka förekomsten av CrAssphage (Dutilh et al., 2014), ett virus som angriper bakterier och som naturligt hittas i höga nivåer i human avföring. Denna analys gjordes för att kunna urskilja huruvida en eventuell ökning av ARB och/eller ARG sannolikt skulle bero på selektion på plats i jorden eller om det snarare är en effekt av fekalierester från slammet (som innehåller mer ARB och ARG än vad jord i allmänhet gör). Parallellt använde vi oss också av klassisk bakterieodling på agarplattor där det totala antalet bakteriekolonier och de relativa resistensnivåerna för tre antibiotika, ampicillin, tetracyklin och ciprofloxacin, analyserades.

2 Material och metoder

2.1 Provtagning

Fältförsöksområdet är uppdelat i 36 mindre rutor (ca 6 m × 20 m vardera), där antingen 0, 4 eller 12 ton rötat slam per hektar tillförts var fjärde år sedan 1981 (Andersson, 2015, tabell 2.1). Förutom avloppsslam har rutorna också fått kvävegödsel motsvarande 0, 50 eller 100 % av rekommenderad mängd av SLU och hushållningssällskapet. De rutor som fått kvävegödsel har också fått fosfor- och kaliumnäring i rekommenderade doser. Totalt innehåller studiematrisen nio olika behandlingskombinationer i fyra replikat vardera. På grund av praktiska och ekonomiska begränsningar bestämde vi att utesluta de rutor som hade getts 50 % av den rekommenderade mineralkvävegivan vilket betyder att 24 av de 36 rutorna provtogs (rutor i fet stil i tabell 2.1).

0t/ha, 0 N	4t/ha, 0 N	12t/ha, 0 N	4t/ha, 0 N	12t/ha, 0 N	0t/ha, 0 N
0t/ha, 50% N	4t/ha, 50% N	12t/ha, 50% N	4t/ha, 50% N	12t/ha, 50% N	0t/ha, 50% N
0t/ha, 100% N	4t/ha, 100% N	12t/ha, 100% N	4t/ha, 100% N	12t/ha, 100% N	0t/ha, 100% N
0t/ha, 50% N	4t/ha, 50% N	12t/ha, 50% N	4t/ha, 50% N	12t/ha, 50% N	0t/ha, 50% N
0t/ha, 0 N	4t/ha, 0 N	12t/ha, 0 N	4t/ha, 0 N	12t/ha, 0 N	0t/ha, 0 N
0t/ha, 100% N	4t/ha, 100% N	12t/ha, 100% N	4t/ha, 100% N	12t/ha, 100% N	0t/ha, 100% N

Tabell 2.1
Schematisk överblick
av fältförsöksområdet.

Vart fjärde år har varje ruta fått antingen 0, 4 eller 12 ton slam/ha (torrvikt) i kombination med 0, 50 eller 100% av rekommenderad mängd kvävegödsel (N). Vi provtog jord från 24 av de 36 rutorna (markerade med fetstil) två gånger, dels nästan fyra år efter slamgivan 2013 och dels 15 dagar efter den senaste slamgivan 2017.

Jordprovtagning ägde rum den 22 augusti 2017 och den 26 september 2017, det vill säga nästan fyra år efter slamgivan 2013 och 15 dagar efter slamgivan 2017. Tolv delprover togs på diagonalen i varje ruta med en provtagare som nådde ungefär 25 cm djupt, blandades och fördes över till sterila 50 ml rör. Rötat slam som producerades vid Sjölanda reningsverk i Malmö i oktober 2016 hade lagrats utomhus till den 11 september 2017 när det spreds på fältförsöksområdet. Det slam som spridits på forskningsfältet myllades ner i jorden och hela försöksområdet, inklusive de rutor som inte slamberikats, plöjdes sedan till ett djup på cirka 25 cm. Flera delprov av det rötade och lagrade slammet togs på spridningsdagen, slogs samman och skickades till vårt laboratorium på Göteborgs Universitet. På samma dagar som jordprovtagningarna ägde rum togs också stickprov av örötat slam och slam direkt från rötammaren (nedan kallat semi-rötat slam) på det kommunala ARV (Sjölanda) som ligger ca 12 km nordväst om fältförsöksområdet. Det är ett av Sveriges största ARV med cirka 300 000 anslutna personer och ett genomsnittligt flöde av 1 350 L/s (VASYD, 2018). De slam- och jordprover som skulle användas för kemiska analyser, DNA-extraktion och sekvensering frystes vid -20 °C och de prover som skulle användas för bakterieodling förvarades vid 4 °C och spreds på agarplattor inom 24 timmar. Totalt analyserades 24+24 jordprover och 1+2+2 slamprover (n=53).

2.2 Kemisk analys

Koncentrationerna av 15 antibiotika (amoxicillin, azithromycin, cefadroxil, ciprofloxacin, doxycyklin, erytromycin, klaritromycin, klindamycin, metronidazol, nitrofurantoin, norfloxacin, ofloxacin, oxytetracyklin, sulfametoxazol, tetracyklin) och en antibakteriell biocid (cetyltrimetylammonium-klorid, CTAC) bestämdes i jord- och slamprover med hjälp av vätskekromatografi-tandem-masspektrometri (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS). Interna standarder och surrogat-standarder (50 ng) adderades till jord- och slamprover (0,1 g) och tre extraktioner gjordes med olika lösningsmedel, metanol och vatten (7:3) med 0,1 % myrsyra; 1,5 ml acetonitril och 1,5 ml 5 % trietylamin i metanol/vatten (1/3). Proven homogeniserades i rör med zirkonium-kulor med hjälp av en Mini Beadbeater (Biospec. Bartlesville, USA) (4 min, 42 000 oscillationer per minut), och centrifugerades (10 min, 14 000 rpm). Protokollet upprepades för de tre lösningsmedlen individuellt varpå supernatanterna kombinerades, tilläts avdunsta tills volymen var 20 µl och blandades sedan med ytterligare 20 µl av en vatten-metanol-lösning (1:1) med 0,1 % myrsyra.

Proven analyserades med hjälp av en avancerad mass-spektrometer (Quantum Ultra EMR (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA)) som kopplats till en vätske-kromatografi-pump (Accela, Thermo Fisher Scientific) och en automatisk provtagare (PAL HTC, CTC Analytics AG, Zwingen, Schweiz). Ytterligare information om metoden och analysdetaljer som till exempel kollisionsenergier och prekursor/produkt-joner finns beskrivna i tidigare publikationer (Grabiec et al., 2012, Rutgersson et al., 2020). Tröskelvärden för kvantifiering bestämdes från standardkurvor som baserats på upprepade mätningar av jordprov med kända, låga koncentrationer av de ämnen som skulle analyseras. Flera olika typer av blankprover (i.e. prov som inte innehåller något av de utvalda ämnena och därför inte ska ge något utslag i mätningen) analyserades också för att kontrollera till exempel kontaminerings effekter från föregående prov.

2.3 Bioreporteranalys av biotillgängligt Cu och Zn

Alla metalljoner som finns i en viss miljö är inte tillgänglig för bakterierna där, då metalljonerna kan vara hårt bundna till tex partiklar. Koncentrationen av biotillgängligt Cu och Zn i jordextrakt bestämdes med hjälp av bakteriestammarna *Pseudomonas fluorescens* DF57-Cu15 (Tom-Petersen et al., 2001) och *P. putida* KT2440.2431 (Hynninen et al., 2010) som modifierats genetiskt och fungerar som bioreportrar. Stammarna bär på luxAB-gener som uppregleras när metaller finns närvarande vilket leder till en mätbar ljussignal, så kallad bioluminescens. Koncentrationen av biotillgängligt Cu och Zn analyserades i jord från båda provtagningstillfällena genom att 5 g jord blandades med 25 ml vatten, skakades vid 250 rpm i 2 timmar vid rumstemperatur och centrifugerades (10 000 · g, 10 min, 22 °C). Supernatanterna överfördes till sterila polystyrenrör och förvarades vid -18 °C tills bioreporteranalyserna ägde rum enligt protokoll som publicerats tidigare (Brandt et al., 2008, Song et al., 2017). Vid varje körning analyserades samtliga prov och standarder på samma platta för varje bioreporter för att undvika effekter på grund av teknisk variabilitet (Hansen et al., 2019).

Bioluminescens-signalen analyserades med hjälp av en BMG FluoStar Optima plattläsare (BMG Labtech, Offenburg, Tyskland) och koncentrationen av biotillgängligt Cu och Zn kvantifierades med hjälp av koncentrationen av lösta Cu²⁺- och Zn²⁺-joner i sulfat-standardlösningar av respektive metall. Bioreporter-stammen *P. fluorescens* DF57-40E7 som har ett konstant uttryck av luxAB-generna (Tom-Petersen et al., 2001) analyserades parallellt för att korrigera för matris-effekter i provet vilket har studerats i detalj i tidigare studier (Brandt et al., 2008).

2.4 Metagenomsekvensering

En detaljerad metodbeskrivning finns att hitta i originalartikeln (Rutgersson et al., 2020) men sammanfattningsvis isolerades DNA från jord- och slamprover (48 + 5 prover) i slumpvis ordning med E.Z.N.A. soil DNA-kit (Omega bio-tek, Norcross, GA, USA). Proven skickades till SciLifeLab i Stockholm där de metagenomsekvenserades med Illumina NovaSeq 6000. När sekvenserings-datan kvalitetsfilterats användes den för att söka i olika databaser där man samlat information om gener med kända funktioner för att på så sätt identifiera och kvantifiera förekomsten av ARG, MRG, BRG och MGE. Eftersom många gener har flera funktioner finns vissa sekvenser representerade i fler än en av de fem kategorierna. Endast gener som detekterades i minst 33 % av alla prover och i medeltal fem gånger per prov inkluderades i analyserna. Vi analyserade också 16S rRNA-genen eftersom den innehåller regioner av DNA som är specifika för olika bakterier vilket användes för att studera förändringar i bakteriesammansättning på fylum-, klass-, ordning-, familj- och släktnivå. CrAssphage-genomsekvensen hämtades från GenBank (NC_024711.1) och jämfördes med vår sekvenseringsdata så att förekomsten av CrAssphage i de olika proven kunde beräknas.

2.5 Bakterieodling

Jord och örötat slam (0,5 g/ml), semi-rötat, rötat och lagrat slam (0,25 g/ml) homogeniserades genom intensiv omskakning (2 min) i sterila Falcon-rör med saltlösning (0,85 %) och glaspärlor (4 mm ø Marienfeld, Lauda-Köningshofen, Tyskland). Suspensionerna tilläts sedimentera i 5 min innan 4 ml hölls över till nya rör. Därifrån spädades blandningarna 1:9 med saltlösning i flera steg och 100 µl av lämpliga spädningar inokulerades på agarplattor i triplikat. Två olika typer av plattor användes, ECC (CHROMagar, Paris, Frankrike) för beräkning av presumtiva *Escherichia coli* och andra koliformer och R2 agar (R2A) (Oxoid, Basingstoke, UK) för att bestämma antalet aeroba heterotrofer. Båda typerna av agarplattor framställdes både utan antibiotika och med tillsats av ampicillin 8 µg/ml, tetracyklin 8 µg/ml eller ciprofloxacin 0,5 µg/ml, vilket resulterade i åtta typer av plattor totalt. Antibiotikakoncentrationerna härleddes från kliniska gränsvärden presenterade av EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/) eller, för tetracyklin, ECOFF-värdet för *E. coli* (EUCAST, 2018). Antalet kolonier som växte på plattor efter inkubering, 18–20 h i 37 °C för ECC-plattor och 2 dagar vid rumstemperatur för R2A-plattor, räknades och resultaten presenteras som kolonibildande enheter (*colony forming units*, CFU) per gram torrsustans. Detektionsgräns definierades som närvaron av en koloni på en av plattorna i det minst spädda triplikatet och hälften av detta värde användes för plattor utan några kolonier alls. Vid ett tillfälle var antalet kolonier för högt för att räkna för samtliga spädningar som gjorts och koloniantalet uppskattades till 450 CFU/platta för den högsta spädningen som användes.

2.6 Statistiska modeller

Alla statistiska analyser utfördes med hjälp av mjukvaran R v3.5.1. Metagenom-sekvenser som matchat till gener vi ville studera normaliserades mot antalet 16S rRNA-gensekvenser i respektive prov. De relativa gen-förekomsterna analyserades därefter med en *overdispersed generalized linear model* där man antar en kvasi-Poisson-fördelning av data. För ARG, MRG, BRG och MGE analyserades både totalantalet sekvenser för varje genkategori och förekomsten av enskilda gener.

För odlingsdata logariterades de beräknade koloniantalen (CFUs/g) och de relativa resistensnivåerna för ampicillin, tetracyklin och ciprofloxacin bestämdes genom normalisering med antalet kolonier på motsvarande agarplatta utan tillsatt antibiotikum.

Skillnader i antal kolonier eller relativa resistensnivåer mellan behandlingar analyserades med en linjär modell.

Först utvärderades effekter av den senaste slamspridningen genom att jämföra endast prov från de åtta rutor från provtagningsrunda 2 som mottog antingen 0 eller 12 ton slam/ha men inget mineralkvävegödsel. I nästa steg inkluderades alla jordprover och effekter av slamgiva, kvävegödsling och provtagningstidpunkt analyserades, både separat och kombinerat med varandra. Skillnader mellan grupper utvärderades med hjälp av F-test och visas som faldighetsförändringar (*fold changes*, FC) där ett värde högre respektive lägre än 1 representerar en ökning eller minskning. Erhållna p-värden korregerades för multipel testning med hjälp av Benjamini-Hochbergs metod *false discovery rate* (fdr) där ett värde lägre än 0,05 ansågs vara statistiskt signifikant (Benjamini and Hochberg, 1995). Mer detaljerad information om statistiska modeller finns i (Rutgersson et al., 2020).

3 Resultat

3.1 Antimikrobiella koncentrationer i slam och jord

I stickproverna av örötat och semi-rötat slam som tagits innan och under röttningsprocessen. Av de 16 antibiotika och antibakteriella ämnen som analyserades med masspektrometri detekterades azithromycin, ciprofloxacin, CTAC, doxycyklin, klaritromycin, klindamycin, norfloxacin, ofloxacin och tetracyklin i tre av de fyra proven. Det fjärde provet innehöll samma substanser med undantag från tetracyklin som inte kunde kvantifieras. Dessa åtta substanser detekterades också i det rötade och lagrade slamprovet som spreds på fälten. Koncentrationerna av substanserna som detekterades i slam sträckte sig över fyra tiopotenser, från 3–75 339 µg/kg (torrvikt), med CTAC i den högsta koncentrationen i alla prov. Jämfört med örötat slam hade de semi-rötade proven lägre koncentrationer av de flesta ämnen. Det rötade och lagrade slammet som användes som gödselmedel på åkrarna hade lägre koncentrationer av alla detekterade föreningar jämfört med slam som provtogs under röttningsprocessen.

Ingen av de 16 analyserade substanserna nådde över kvantifieringsgränsen i jordproverna som togs före slamgivan 2017. Vid den andra provtagningen, efter slamgivan, kunde följande substanser kvantifieras i minst ett jordprov: ciprofloxacin (2 prov), CTAC (fyra prov), klaritromycin (tre prov), klindamycin (1 prov) och tetracyklin (1 prov). Inga antibiotika kunde detekteras i prover som inte fått någon slamgiva medan CTAC detekterades i ett av dessa prov. Koncentrationerna av de detekterade ämnena i jord varierade mellan 1–68 µg/kg torrvikt.

3.2 Cu och Zn biotillgänglighet i jord

I jord från provtagningsomgång 1, ca fyra år efter den senaste slamgivan, var koncentrationen av biotillgängligt Cu ($[Cu]_{bio}$) högre ju mer slam som applicerats. Däremot var den relativa biotillgängligheten (i.e. $[Cu]_{bio}/[Cu]_{total}$ 0,03–0,04 % oberoende av behandling (tabell 3.1). I jord som provtogs två veckor efter slamgivan 2017 var koncentrationerna av biotillgängligt Cu under kvantifieringsgränsen för samtliga prov. Dock var tröskelvärdet för kvantifiering av $[Cu]_{bio}$ ungefär tre gånger högre vid de analyser som gjordes efter jämfört med före slamgivan 2017. De biotillgängliga Zn-koncentrationerna var alltid lägre än detektionsgränsen i samtliga prover från båda provtagningsomgångarna.

Treatment	IF	$[Cu]_{bio}$ (µg/g)	$[Cu]_{total}$ (µg/g)	$[Cu]_{bio}/[Cu]_{total}$ (%)	pH ^a (H ₂ O)
0t/ha, 0 N	1,6±0,07	0,003±0,000	10	0,03±0,001	7,1
0t/ha, 100% N	1,5±0,07	0,002±0,000	9	0,03±0,001	6,9
4t/ha, 0 N	3,1±0,32	0,005±0,000	14	0,03±0,003	6,9
4t/ha, 100% N	2,6±0,26	0,004±0,000	14	0,03±0,003	6,9
12t/ha, 0 N	7,5±0,8	0,008±0,000	19	0,04 ±0,001	6,8
12t/ha, 100% N	5,9±1,1	0,007±0,000	20	0,03 ±0,002	6,8

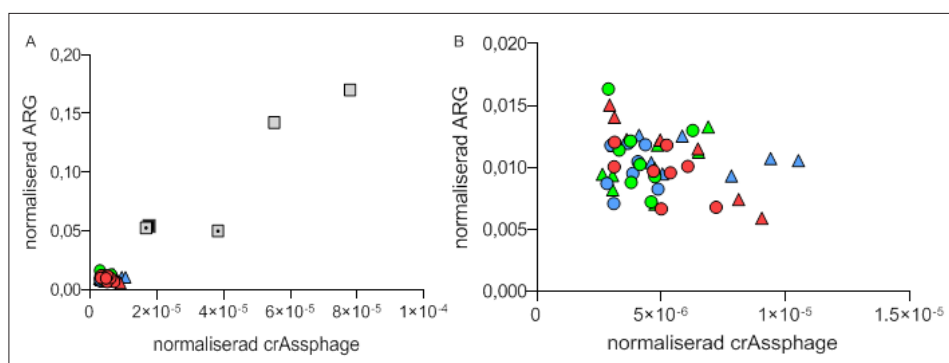
Analys av biotillgängligt Cu med hjälp av bioreporter-stammen *Pseudomonas fluorescens* i jord som provtagits nästan fyra år efter den senaste slamgivan (0, 4 eller 12 ton slam per hektar (torrvikt)) och med eller utan kvävegödsel (100% N/0 N). IF-bioreporter-induktionsfaktor (bioluminescens), $[Cu]_{bio}$ - biotillgängligt Cu i jord, $[Cu]_{total}$ - total-Cu i jord. Medelvärden ± standardavvikelser (n = 4) visas. ^aData från Andersson (2015).

Tabell 3.1

Analys av biotillgänglig och total kopparhalt i jord.

3.3 ARG, MRG, BRG, MGE och CrAssphage

Metagenom-sekvenseringen resulterade i 32–73 miljoner DNA-sekvenser per prov. Analysen som syftade till att undersöka effekterna från den senaste maximala slamgivan gav inga statistiskt signifikanta resultat, varken på totalnivå eller när gener analyserades individuellt. I analysen som inkluderade alla datapunkter observerades en signifikant ökning av en enda ARG, genen *oqxB*, som förekom oftare i jordar gödslade med mine-ralkvävegödsel ($FC=1,15$, $fdr=0,008$). På samma gång detekterades *oqxB* mer sällan i den andra provtagningsomgången jämfört med den första ($FC=0,91$, $fdr=0,004$). Inga förändringar i ARG-förekomst sågs när effekt av slamgiva utvärderades. När det gäller metallresistensgener korrelerade kvävegödsling med ökad förekomst av *ctpC* ($FC=4,25$, $fdr=0,013$) och *nikR* ($FC=2,00$, $fdr=0,022$) men minskad nivå av *ziaA* ($FC=0,40$, $fdr=0,013$). Varken slamgiva eller provtagningspunkt påverkade nivåerna av individuella MRG. Vid den andra provtagningsomgången sågs en minskad förekomst av biocidresistensgenen *actA* ($FC=0,65$, $fdr=0,040$) medan nivåerna av samma gen var högre i kvävegödslade jordar ($FC=1,64$, $fdr=0,020$) tillsammans med *bepC* ($FC=1,91$, $fdr=0,020$). Den totala förekomsten av MGE-gener var signifikant högre i jordar från den andra provtagningsomgången jämfört med den första ($FC=1,26$, $p=0,030$). När analysen gjordes på individuella gener observerades ISCR2 i signifikant högre nivåer i slamgödslade jordar ($fdr=0,042$, $FC=1,73$ och $FC=1,24$ för gruppen som fått 4 respektive 12 ton slam per hektar). En positiv korrelation observerades för den relativa förekomsten av ARG och crAssphage som båda minskade i slam under rötningsprocessen (figur 3.1A). Det fanns däremot ingen korrelation mellan de båda om enbart jordprover studerades (figur 3.1B).



Figur 3.1
Korrelation av ARG och crAssphage-förekomst i jord- och slamprover (A) ($R^2=0.93$) och i endast jordprover (B) ($R^2=0.06$).

Jord provtogs två gånger, fyra år efter (cirklar) och 15 dagar efter (trianglar) spridning av rötat och lagrat avloppsslam (röd; inget slam, grön; 4 ton/ha (ts), blå; 12 ton/ha (ts)). Orötat slam (grå fyrkanter), semi-rötat slam (grå fyrkanter med svart prick), rötat och lagrat slam (svart fyrkant, delvis skydd).

3.4 Bakteriesammansättning

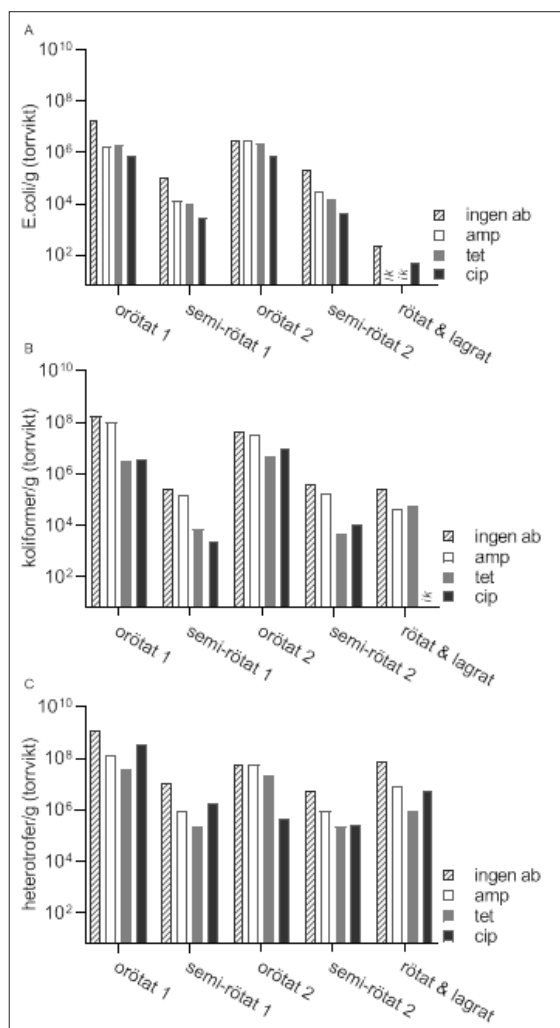
Förekomsten av sekvenser från ett fylum, *Elusimicrobia* och en klass, TK10, från fylum *Chloroflexi*, var signifikant högre i slamberikade jordar. De få förändringar i bakteriesammansättning som orsakades av slamspridning står i viss kontrast till resultaten från när effekter av provtagningspunkt eller kvävegödsling beaktades då 34 respektive 63 taxa ändrades signifikant (tabell 3.2). Effektstorlekarna var dock ganska blygsamma och varierade från $FC = 0,05$ – $2,87$.

den relativa mängden av *Pseudomonas* ökat 100 gånger och översteg till och med de nivåer som fanns i örötat slam. Också i jordprover observerades sekvenser som matchade *Pseudomonas* i alla prover. Den totala relativa förekomsten av de elva släktena var ungefär 10 gånger lägre i jordprover än i det slam som spreds på åkrarna. Förekomsten i jord var inte signifikant olika mellan behandlingsgrupperna eller provtagningstidpunkterna.

3.5 Odlingdata

3.5.1 Odlingbara bakterier i slam

Semi-rötat slam hade lägre CFU/g torrsvikt än örötat slam på alla typer av plattor som användes för odlingsanalyser. Minskningen var 10–250 gånger för *E. coli* (figur 3.2A), 100–1 500 gånger för andra koliformer (figur 3.2B) och 2–200 gånger för heterotrofa bakterier (figur 3.2C). Antalet *E. coli* i rötat och lagrat slam hade reducerats ytterligare 430–880 gånger på ECC utan antibiotika och detekterades inte alls på plattor med ampicillin eller tetracyklin. En enda *E. coli*-koloni hittades på plattor med ciprofloxacin (figur 3.2A). För koliformer detekterades inga ciprofloxacinresistenta kolonier i det behandlade och lagrade slammet, men nivåerna av tetracyklin-resistenta koliformer var högre i rötat och lagrat slam än i semi-rötat (figur 3.2B). Ett liknande mönster sågs för R2A-plattor där det behandlade slammet som lagrats i 11 månader utomhus hade 3–19 gånger högre koloniantal än semi-rötat slam (figur 3.2C). Efter normalisering med antalet kolonier på plattor utan antibiotika var dock de relativa resistensnivåerna lägre i det rötade och lagrade slammet än medelvärdena för de övriga slamstickproven.



Figur 3.2

Odlingsbara bakterier och resistensegenskaper hos dessa i olika typer av slam.

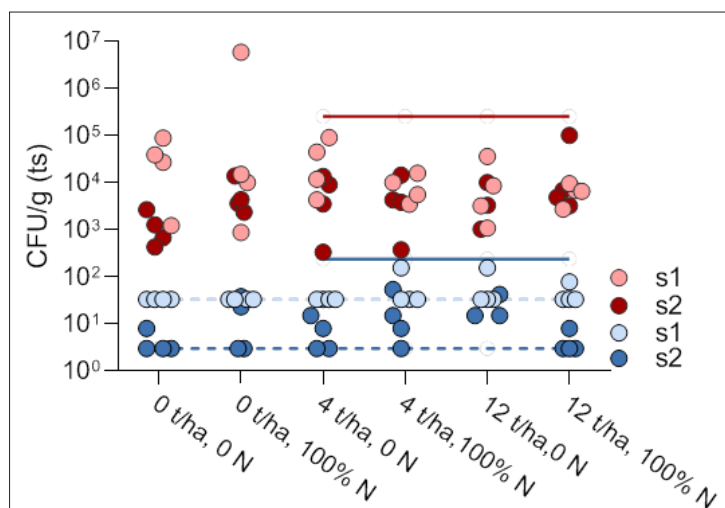
CFU/g slam (torrsvikt) av *E. coli* (A), andra koliformer (B) och heterotrofa bakterier (C) på plattor utan antibiotika eller med ampicillin 8µg/ml (amp), tetracyklin 8µg/ml (tet) eller ciprofloxacin 0.5µg/ml (cip). Örötat och semi-rötat slam provtogs vid två tillfällen och det rötade och lagrade slammet provtogs den dag då det spreds på åkermark. ik- inga kolonier.

3.5.2 Odlingbara bakterier i jord

Inga signifikanta skillnader kunde observeras om man jämförde de två behandlingar där man annars skulle förväntat sig störst skillnad, d v s prover tagna två veckor efter slamgiva i högdosgruppen (12 ton/ha) mot kontroll (0 ton/ha) från samma tidpunkt. Statistiska skillnader mellan grupper som rapporteras nedan kommer från den mer komplexa analysen som inkluderar alla datapunkter och tre oberoende variabler.

Förekomst av presumtiva *E. coli* och andra koliformer i jord

Baserat på färg räknades två typer av kolonier på ECC-plattor, presumtiva *E. coli* (blå) och andra koliformer (röda). I den första provtagningsomgången detekterades blå kolonier på ECC-plattor utan antibiotika från 3 av de 24 jordproven. Vid den andra provtagningsomgången, 15 dagar efter den senaste slamgivan, detekterades presumtiva *E. coli* i 11 av 23 jordprover, men då vi spädde jordproven mindre vid utodlingen var detektionsgränsen denna gång tio gånger lägre jämfört med vid den första analysen (figur 3.3). Förekomsten av presumtiva *E. coli* på ECC-plattor utan antibiotika förändrades inte signifikant för någon av de tre variablerna (slamgiva, kvävegödsel eller provtagnings tidpunkt). Inga *E. coli* hittades på ECC-plattor med ampicillin, tetracyklin eller ciprofloxacin från jordprover vid någon av provtagningsarna.



Figur 3.3

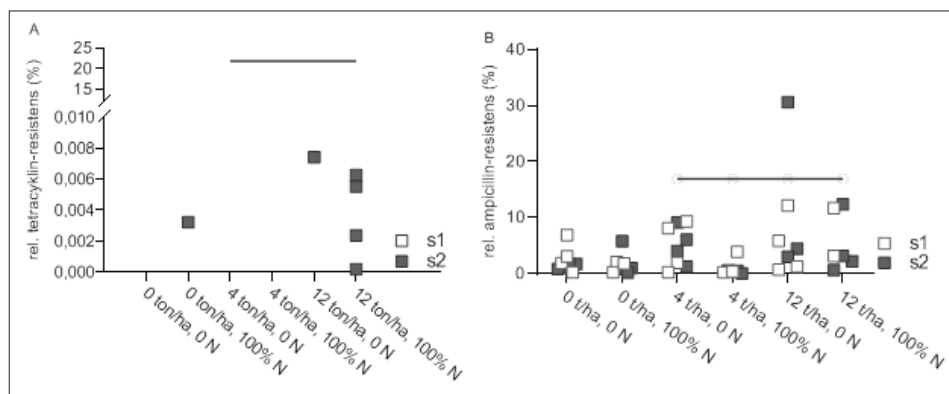
Odlingbara *E. coli* och andra koliforma bakterier i jord.

Antal kolonier av *E. coli* (blå) och andra koliformer (röda) på ECC-plattor från jord som provtagits vid två olika tidpunkter (s1 och s2), fyra år respektive 15 dagar efter slamtillförsel (0, 4 eller 12 ton per hektar (torrvikt)) och med eller utan kväve-gödsel (100% N/0 N). Koloniantal i slammet visas som linjer. Detektionsgränser för *E. coli* vid de två tidpunkterna representeras av streckade linjer i motsvarande färg.

Antalet röda kolonier, som representerar andra koliformer än *E. coli*, som växte på ECC-plattor utan antibiotika var färre i den andra provtagningsrundan (FC = 0,29, fdr = 0,018) (figur 3.3). Den relativa halten av tetracyklin-resistenta koliformer ökade signifikant under andra provtagningsrundan (FC = 5,16, fdr = 0,016) (figur 3.4A) medan ampicillin-resistenta koliformer inte var signifikant olika mellan behandlingarna (figur 3.4B). Ciprofloxacinresistenta koliformer hittades inte i jordprover vid någon provtagnings tidpunkt.

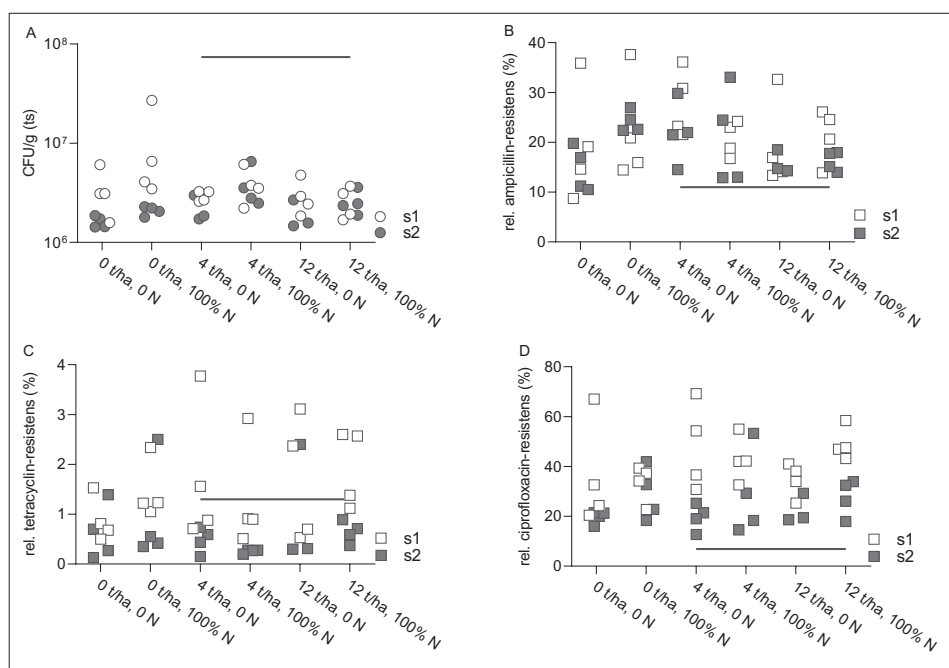
Heterotrofa bakterier i jord

Färre CFU per gram jord växte på R2A-plattor utan antibiotika i den andra provtagningsrundan jämfört med den första (FC = 0,65 fdr = 0,006) (figur 3.5A). Den relativa resistensnivån för ampicillin skiljde sig inte signifikant åt mellan grupper (figur 3.5B) medan de relativa halterna av både tetracyklin- och ciprofloxacin-resistenta heterotrofer var lägre vid den senare provtagningen jämfört med den första (FC = 0,38 fdr = 0,0005 respektive FC = 0,60 fdr = 0,0002) figur 3.5C-D). Inga skillnader i resistensnivåer kunde kopplas till tillförsel av kvävegödsel eller slam.



Figur 3.4
Relativa resistensnivåer av
odlingsbara koliformer i jord.

Relativa resistensnivåer av koliformer på ECC-plattor med tetracyklin 8µg/ml (A) eller ampicillin 8µg/ml (B) i jord provtagen vid två olika tidpunkter (s1 och s2, fyra år respektive 15 dagar efter slamgiva) o, 4 eller 12 ton per hektar (torrvikt) och med eller utan kväve-gödsel (full N/no N). Notera att alla utom sex prover i A var under detektionsgränsen och är därför inte inkluderade i figuren. Den relativa förekomsten av tetracyklin-resistenta koliformer var högre vid de andra provtagningsomgången (s2) (FC=5,16, fdr=0,016). Den relativa förekomsten av ampicillin-resistenta koliformer förändrades inte signifikant mellan behandlingar (B). Ingen graf visas för ciprofloxacin-resistenta koliformer eftersom alla prover var under detektionsgränsen. Linjen representerar den relativa nivån av resistenta koliformer i det rötade och lagrade slammet.



Figur 3.5
Relativa resistensnivåer av
odlingsbara, heterotrofa
bakterier i jord.

Koloniantal på R2A-plattor utan antibiotika (A) och de relativa resistensnivåerna för ampicillin 8µg/ml (B), tetracyklin 8µg/ml (C) och ciprofloxacin 0.5µg/ml (D) i jord som provtogs två gånger (s1 och s2), fyra år respektive 15 dagar efter slamgiva; o, 4 eller 12 ton per hektar (torrvikt) och med eller utan kväve-gödsel (full N/no N). Motsvarande data för rötat och lagrat slam representeras av linjer. Det enda signifikanta resultatet från R2A-plattor utan antibiotika var att antalet bakterier minskade i s2 jämfört med s1 (FC=0,65 fdr=0,006). Inga signifikanta skillnader observerades för de relativa ampicillin-resistensnivåerna (B). Färre tetracyklin- och ciprofloxacin-resistenta heterotrofer detekterades vid s2 jämfört med s1 (FC=0,38 fdr=0,0005 och FC=0,60 fdr=0,0002 (C respektive D), men varken slamtillförsel eller kvävegödsling visade några tecken på skillnader i relativa resistensnivåer på R2A-plattor för något av de tre antibiotika som undersöktes.

4 Diskussion

Inga av de antibiotika som undersöktes kunde detekteras i jord från den första jordprovtagningen, innan slamgödslingen 2017, vilket indikerar att de senaste decennierna av slamspridning inte har lett till ackumulering av dessa antibiotika i jorden. De antibiotika som detekterades i jord från den andra provtagningsomgången hittades alla i jord som behandlats med slam, dock hittades ingen av substanserna konsekvent i alla slambehandlade jordar och de detekterade koncentrationerna var inte uppenbart relaterade till mängden applicerat slam. Laboratorieexperiment har visat att antibiotika i lägre koncentrationer än de som normalt hämmar känsliga stammar kan selektera för antibiotikaresistens (Gullberg et al., 2011, Lundström et al., 2016, Kraupner et al., 2018). De antibiotika som detekterades i rötat och lagrat slam och i jord efter slamgiva hittades alla i högre koncentrationer än teoretiskt uppskattade gränsvärden för effekter (Bengtsson-Palme and Larsson, 2016). Dock har dessa uppskattningar gjorts för antibiotika i vattenlösning och bör inte extrapoleras till slam eller jord eftersom många antibiotika adsorberar starkt till partiklar vilket radikalt minskar deras biotillgänglighet (Subbiah et al., 2011, Song et al., 2017). Som exempel detekterades ciprofloxacin i koncentrationer upp till 11,6 mg/kg i orötat slam, vilket är 10 000 gånger högre än den koncentration som orsakade selektion i ett tidigare försök då man tillät två bakteriestammar konkurrera i flytande bakterieodlingsmedium (Gullberg et al., 2011). Det är också 1 000 gånger högre än de lägsta observerade selektiva koncentrationerna i komplexa akvatiska biofilmer (Kraupner et al., 2018) och det överskrider koncentrationen som fullständigt hämmar tillväxten av den stora majoriteten av undersökta vildtypsbakterier (EUCAST, 2018). Trots detta var andelen ciprofloxacin-resistenta *E. coli* i orötat slam måttlig (figur 2A). Det visar att nästan inget av det ciprofloxacin som återfanns i slammet var tillgängligt för bakterierna och kunde därför inte heller selektera fram resistenta bakterier. I det rötade och långtidslagrade slammet var koncentrationen av ciprofloxacin 7–65 gånger lägre vilket ytterligare reducerar sannolikheten för selektiva effekter.

Eftersom det ännu inte finns några definierade gränsvärden för vilka antibiotika-koncentrationer som har selektiva effekter i slam och jord undersöks risker för selektion sannolikt bäst genom att studera nivåerna av resistenta bakterier och förekomsten av resistensgener. Vi kunde inte observera några signifikanta förändringar i ARG-förekomst som en konsekvens av slamtillförsel, vilket är i linje med frånvaro av selektiva effekter av antibiotikarester i slamgödslad jord. I denna studie var både ARG och ARB högre i slam än i jord, men som framgår av Karkman et al, (2019) kan ökade ARG-nivåer ofta förklaras av fekalierester. Faktum är att nivåerna av crAssphage som indikator för human avföring och ARG var väl korrelerade i slamprover eftersom båda reducerades på ett liknande sätt under rötningsprocessen (figur 1A) och vi fann därmed inga tecken på resistens-selektion i slammet. Bristen på korrelation mellan ARG och crAssphage i jordprover (figur 1B) är förväntad, eftersom mängderna som beräknas adderas från slamgivan är försumbart i förhållande till de nivåer som redan finns i jorden, inklusive i kontrolljordarna som aldrig gödslats.

De relativa nivåerna av bakterier som var resistenta mot ampicillin, tetracyklin och ciprofloxacin var inte högre i jordar som gödslats med slam än i jordar som inte gödslats alls. Detta är inte förvånande om vi antar att det inte sker någon selektion i jorden, och att en ökning skulle förklaras enbart genom tillsats av resistenta bakterier från slammet. Om man räknar med ett plogdjup på 25 cm och en jorddensitet på 1 500 kg/m³ spås slambakterierna ungefär 900 gånger och 300 gånger i jorden för de två slamgivorna. I jordprover kunde ingen resistens mot ampicillin, tetracyklin eller ciprofloxacin hos *E. coli* påvisas alls. Dessutom var antalet kolonier av koliformer och heterotrofa bakterier ofta oförändrat eller till och med lägre i jord efter den senaste slamgivan, även för de

rutor där ingen slam lagts på. En förklaring kan vara att tarmbakterier från vilda djur, till exempel fåglar som ätit av grödorna, fanns i det översta jordskiktet i den första provtagningen men var mindre tillgängliga efter plöjningen som skedde strax efter slamgivan. Detta stämmer överens med resultaten i en nyligen publicerad artikel där jordprover från Arktis uppvisade förhöjda nivåer av ARG, vilket föreslås härröra från bakterier i avföring från vilda djur (McCann et al., 2019).

Cetyltrimetylammoniumklorid, CTAC, detekterades i högst koncentration i alla slamprover. Rötat och lagrat slam innehöll 8,5 mg/kg (torrvikt) CTAC, vilket är lägre än vad som tidigare rapporterats i rötat slam från svenska ARV (Östman et al., 2017). CTAC var också den vanligaste föreningen som detekterades i jord, funnen i fyra prover, om än i 100–1 000 gånger lägre koncentrationer än i det applicerade slammet. Vid ett tillfälle upptäcktes CTAC i jord som inte hade fått något slam. Vi antar att detta är resultatet av en oavsiktlig överföring av material under processens gång men eftersom ingen antibiotika hittades, varken i detta prov eller i någon av de andra kontrolljordarna, utgår vi ifrån effekten från den potentiella kontamineringen är försumbar. CTAC innehåller kvaternära ammoniumkationer (QAC), en grupp kemikalier som produceras i stora volymer och används som ytaktiva ämnen och mjukgörare i hushållsprodukter, men också som desinfektionsmedel på grund av deras antimikrobiella egenskaper. Gener som ger resistens mot QACs är associerade med ko-selektion eftersom de ofta finns på mobila genetiska element som också innehåller andra resistens- eller mobiliserande gener (Chapman, 2003). Medan förekomsten av resistensgener för varken antibiotika, metaller eller biocider förändrades när tillförsel av slam var den enda förklarande variabeln, var en MGE, genen ISCR2, signifikant högre i slamgödslade jordar jämfört med kontroller. Dock var effekten ganska liten och följde inte det logiska dos-respons-mönstret i och med att skillnaden var större i de jordar som fått 4 ton slam per hektar jämfört med de som fått 12 ton slam per hektar. Därmed kunde vi inte hitta belägg för effekter av kvarvarande biocidrester i jorden.

Även om metaller som Cu och Zn har potential att ko-selektera för antibiotikaresistensgener (Berg et al., 2010, Song et al., 2017, Zhao et al., 2019) indikerar vår bioreporter-data att nivåerna av biotillgängligt Cu och Zn var konsekvent låga i alla prover och att slamgödsling endast hade små effekter på $[Cu]_{bio}$. De observerade koncentrationerna av $[Cu]_{bio}$ är mycket lägre än de nivåer som krävs för selektion i tidigare studier (Hagerberg et al., 2011, Song et al., 2017). Dessutom är nivåerna av $[Cu]_{total}$ i slamberikade jordar (tabell 2, (Andersson, 2015)) lägre än de PNEC-värden som beräknats för europeiska jordar (Monteiro et al., 2010). Våra resultat stämmer också överens med tidigare studier där man simulerat drygt 100 år av slamberikning på åkermark utan att metaller ackumulerades till nivåer som krävs för att utöva ett selektionstryck (Poulsen et al., 2013, Lekfeldt et al., 2014). Följaktligen ledde långvarig applicering av avloppsslam endast till mindre förändringar av jordbakteriesammansättning och ledde inte till förändringar i bakteriesamhällets tolerans mot Cu.

Kemisk analys, metagenomsekvensering och odling av bakterier avslöjade inte några tecken på ackumulering av antimikrobiella medel eller anrikning av resistensgener eller resistent bakterier i jord som har gödslats med rötat och lagrat avloppsslam under de senaste decennierna. De flesta av de observerade skillnaderna i jord var i stället kopplade till kvävegödsling. Två av resistensgenerna vars nivåer var signifikant *förhöjda* i kvävegödslade jordar, *oqxB* och *bepC*, kodar för delar av membranbundna effluxpumpar som svarar på förhöjda nivåer av toxiska föreningar t.ex QAC (Hansen et al., 2007, Posadas et al., 2007). Nivåerna av kompletterande gener som krävs för funktionella pumpar var dock inte förhöjda och i den andra omgången av provtagning *minskade oqxB*-nivåerna signifikant. Förekomsten av tre ytterligare resistensgener, *ctpC*, *actA* och *nikR*, kopplade till Zn-efflux (Padilla-Benavides et al., 2013), Cu-känslighet (Tiwari et al., 1996) respektive Ni-reglering (De Pina et al., 1999), var högre i kvävegödslade jordar jämfört med kontroller, medan *ziaA*, en annan gen associerad med export av Zn (Thelwell et al., 1998)

istället minskade i dessa jordar. I den andra provtagningsomgången var actA nu betydligt lägre jämfört med kontrollerna. Sådana mönster överensstämmer inte med att metaller, biocider eller antibiotika har en direktpåverkan genom att främja bakterier som bär på resistensgener mot dessa ämnen utan pekar snarare på indirekta förändringar i resistensgenförekomst som ett resultat av förändringar i artsammansättning. Oorganiska gödselmedel har tidigare visat sig ha en stark effekt på ARG-sammansättningen i mikrobiella samhällen i jord och i linje med vår tolkning föreslogs det vara en konsekvens av förändringar i artsammansättning snarare än omfattande horisontell genöverföring (Forsberg et al., 2014). Metagenomik-data från analysen av bakteriesammansättningen i jord från de olika behandlingsgrupperna visade att förekomsten av fler än 30 respektive 60 taxa förändrades signifikant i modellerna som undersökte betydelsen av provtagnings tidpunkt och kvävegödsling. Däremot hade endast två taxa, *Chloroflexi* och *Elusimicrobia*, båda tidigare funna i rötat slam (Björnsson et al., 2002, McIlroy et al., 2015, Lin and Li, 2018) signifikant olika förekomst i slambehandlade jordar och kontroller. Ett liknande resultat beskrevs nyligen i en spansk studie där 24 års årlig giva av anaerobt rötat avloppsslam (upp till 80 ton/ha) inte ledde till några signifikanta förändringar i bakteriesammansättning i jord (Urrea et al., 2019).

Effekter på ARG efter långvarig slamberikning av jord har tidigare undersökts. Dock är jämförelser mellan studier ofta komplicerade eftersom sammansättning, förbehandling, volym, frekvens och varaktighet av tillsatt slam varierar mycket mellan studier. Dessutom fokuserar olika studier på olika typer av effekter (gener, levande bakterier i diverse matriser som slam, jord, odlade grönsaker etc). Det finns emellertid situationer där förekomsten av specifika ARG ökar i slamgödslade jordar (Chen et al., 2016, Urrea et al., 2019). I dessa två studier var frekvensen och/eller volymen av tillsatt slam högre än i vår studie (18–80 ton per hektar spritt varje, vartannat eller vart fjärde år). När mängden tillfört slam var i samma nivå som i vår studie sågs ingen ökad förekomst av ARG (Chen et al., 2016) jämfört med kontroller vilket tyder på att doseringen kan vara avgörande. Den relativa förekomsten av ARG i slammet kan naturligtvis också vara av betydelse. Sverige har både en lägre antibiotika-användning och mindre utbredda problem med antibiotikaresistens än de flesta andra länder, vilket också återspeglas i ARG-förekomsten i svenskt avloppsvatten (Hendriksen et al., 2019). Trots att både antibiotikahalter och förekomsten av ARG troligen var högre i den kinesiska studien av Chen et al (2016), åtminstone i örötat slam, ledde en liknande mängd slam som i vår studie inte till någon signifikant ökning av ARG i de kinesiska jordarna. Många koliformer, inklusive *E. coli*, överlever ofta inte bra i jord, vilket också kan bidra till begränsade effekter av slamtillförsel när det gäller ARG-förekomst i jord. Exempelvis visade en nyligen publicerad studie att anaerobt rötat slam innehållande liknande nivåer av koliformer och ungefär 100 gånger fler *E. coli* än i vår studie inte orsakade en anrikning av dessa bakterier i jord jämfört med kontroller 7 respektive 30 dagar efter slamgiva (Murray et al., 2019). Inte heller fann Rahube et al. (2014) någon ökning av odlingsbara koliformer i jord som provtogs 100 dagar efter en enda slamgiva, varken när givan bestod av 10 ton rötat slam/ha (med liknande nivåer av koliformer som vår studie) eller 28 ton örötat slam (med en mycket högre bakteriell belastning). I ytterligare överensstämmelse med våra resultat observerade de ingen ciprofloxacinresistens, en mycket låg tetracyclinresistens och en hög ampicillinresistens bland koliformer i jord utan signifikanta skillnader jämfört med kontroller. Sammantaget så finns det platser och förfaranden som är förknippade med ökade ARG i jordar, och eventuellt också risker för uppkomst och överföring av resistens, men för de förhållanden som undersöktes här fanns inga indikationer på någon betydande risk.

Sammanfattningsvis kunde vi inte hitta tecken på ackumulering av antimikrobiella medel eller anrikning av resistensgener eller antibiotika-resistenta bakterier i jord som berikats med rötat och långtidslagrat avloppsslam (upp till 12 ton/ha vart fjärde år) under 36 år. Inga tecken på ko-selektion via metaller eller biocider analyserat som förekomst av

MRG och BRG kunde heller observeras. Dessutom iaktogs mycket få förändringar i bakteriesammansättning som berodde på slamtillförsel. Vi tillstår att även om metagenomsekvensering visserligen är en bred och explorativ metodik, är den mindre känslig än t.ex. PCR varför subtila förändringar i gennivåer kan förbli oupptäckta. Samtidigt finns det ofta andra utmaningar med att tolka PCR-analyser, inklusive specificitet. Det bör också noteras att Sverige har en gynnsam position jämfört med många andra delar av världen när det gäller antibiotikakonsumtion och kliniska resistensnivåer. Eftersom kommunalt avlopp speglar resistenssituationen för den bidragande befolkningen (Hutinel et al., 2019), är det möjligt att avloppsslam i länder med högre antibiotika-användning, större resistensbelastning eller mindre effektiv avloppsrening än Sverige har mer uttalade mikrobiella effekter om det sprids på åkermark.

Referenser

- Andersson P-G. (2015). Fältförsök med kommunalt avloppsslam från Malmö och Lund under åren 1981–2014. (In Swedish).
<https://hushallningssallskapet.se/?projekten=slamspridning-pa-akermark>
- Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ. (2016). Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environ Int*, 86;140. doi:10.1016/j.envint.2015.10.015
- Benjamini Y, Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate - a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Series B Stat Methodol*, 57;289. doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- Berg J, Thorsen MK, Holm PE, Jensen J, Nybroe O, Brandt KK. (2010). Cu exposure under field conditions coselects for antibiotic resistance as determined by a novel cultivation-independent bacterial community tolerance assay. *Environ Sci Technol*, 44;8724. doi:10.1021/es101798r
- Björnsson L, Hugenholtz P, Tyson GW, Blackall LL. (2002). Filamentous Chloroflexi (green non-sulfur bacteria) are abundant in wastewater treatment processes with biological nutrient removal. *Microbiology-Sgm*, 148;2309.
- Bondarczuk K, Markowicz A, Piotrowska-Seget Z. (2016). The urgent need for risk assessment on the antibiotic resistance spread via sewage sludge land application. *Environ Int*, 87;49. doi:10.1016/j.envint.2015.11.011
- Brandt KK, Holm PE, Nybroe O. (2008). Evidence for bioavailable copper-dissolved organic matter complexes and transiently increased copper bioavailability in manure-amended soils as determined by bioluminescent bacterial biosensors. *Environ Sci Technol*, 42;3102.
- Chapman JS. (2003). Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co-resistance. *Int Biodeterior Biodegradation*, 51;271. doi:10.1016/S0964-8305(03)00044-1
- Chen Q, An X, Li H, Su J, Ma Y, Zhu YG. (2016). Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environ Int*, 92-93;1. doi:10.1016/j.envint.2016.03.026
- De Pina K, Desjardin V, Mandrand-Berthelot MA, Giordano G, Wu LF. (1999). Isolation and characterization of the nikR gene encoding a nickel-responsive regulator in Escherichia coli. *J Bacteriol*, 181;670.
- Dutilh BE, Cassman N, McNair K, Sanchez SE, Silva GG, Boling L, Barr JJ, Speth DR, Seguritan V, Aziz RK, Felts B, Dinsdale EA, Mokili JL, Edwards RA. (2014). A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. *Nat Commun*, 5;4498. doi:10.1038/ncomms5498
- EUCAST. (2018). v_8.o_Breakpoint_Tables.
http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
- Forsberg KJ, Patel S, Gibson MK, Lauber CL, Knight R, Fierer N, Dantas G. (2014). Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature*, 509;612. doi:10.1038/nature13377
- Grabiec R, Fick J, Lindberg RH, Fedorova G, Tysklind M. (2012). Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in environmental samples using liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 100;183. doi:10.1016/j.talanta.2012.08.032

-
- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilback C, Sandegren L, Hughes D, Andersson DI. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathog*, 7;doi:10.1371/journal.ppat.1002158
- Hagerberg D, Manique N, Brandt KK, Larsen J, Nybroe O, Olsson S. (2011). Low concentration of copper inhibits colonization of soil by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and changes the microbial community structure. *Microb Ecol*, 61;844. doi:10.1007/s00248-010-9795-2
- Hansen LH, Jensen LB, Sorensen HI, Sorensen SJ. (2007). Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J Antimicrob Chemother*, 60;145. doi:10.1093/jac/dkm167
- Hansen MG, Marcussen H, Holm PE, Brandt KK. (2019). Evaluation of pH-Dependent Metal Speciation Artifacts in Whole-Cell Bioreporter Analysis. *J Environ Qual*, 48;199. doi:10.2134/jeq2018.10.0352
- Hendriksen RS, Munk P, Njage P, van Bunnik B, McNally L, Lukjancenko O, Roder T, Nieuwenhuijse D, Pedersen SK, Kjeldgaard J, Kaas RS, Clausen PTLC, Vogt JK, Leekitcharoenphon P, van de Schans MGM, Zuidema T, Husman AMD, Rasmussen S, Petersen B, Amid C, Cochrane G, Sicheritz-Ponten T, Schmitt H, Alvarez JRM, Aidara-Kane A, Pamp SJ, Lund O, Hald T, Woolhouse M, Koopmans MP, Vigre H, Petersen TN, Aarestrup FM. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nat Commun*, 10;doi:10.1038/s41467-019-08853-3
- Hutinel M, Huijbers PMC, Fick J, Ahren C, Larsson DGJ, Flach CF. (2019). Population-level surveillance of antibiotic resistance in *Escherichia coli* through sewage analysis. *Euro Surveill*, 24;doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1800497
- Hynninen A, Tonismann K, Virta M. (2010). Improving the sensitivity of bacterial bioreporters for heavy metals. *Bioeng Bugs*, 1;132. doi:10.4161/bbug.1.2.10902
- Karkman A, Pärnänen K, Larsson DGJ. (2019). Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nat Commun*, 10;80. doi:10.1038/s41467-018-07992-3
- Kraupner N, Ebmeyer S, Bengtsson-Palme J, Fick J, Kristiansson E, Flach C-F, Larsson DGJ. (2018). Selective concentration for ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* grown in complex aquatic bacterial biofilms. *Environ Int*, 116;255. doi:10.1016/j.envint.2018.04.029
- Lekfeldt JDS, Magid J, Holm PE, Nybroe O, Brandt KK. (2014). Evaluation of the leucine incorporation technique for detection of pollution-induced community tolerance to copper in a long-term agricultural field trial with urban waste fertilizers. *Environ Pollut*, 194;78. doi:10.1016/j.envpol.2014.07.013
- Lin L, Li XY. (2018). Acidogenic fermentation of iron-enhanced primary sedimentation sludge under different pH conditions for production of volatile fatty acids. *Chemosphere*, 194;692. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.12.024
- Lundström S, Östman M, Bengtsson-Palme J, Rutgersson C, Thoudal M, Sircar T, Blanck H, Eriksson KM, Tysklind M, Flach CF, Larsson DGJ. (2016). Minimal selective concentrations of tetracycline in complex aquatic bacterial biofilms. *Sci Total Environ*, 553;587. doi:10.1016/j.scitotenv.2016.02.103
- McBride MB. (2003). Toxic metals in sewage sludge-amended soils: has promotion of beneficial use discounted the risks? *Adv Environ Res*, 8;5. doi:10.1016/S1093-0191(02)00141-7
-

-
- McCann CM, Christgen B, Roberts JA, Su JQ, Arnold KE, Gray ND, Zhu YG, Graham DW. (2019). Understanding drivers of antibiotic resistance genes in High Arctic soil ecosystems. *Environ Int*, 125;497. doi:10.1016/j.envint.2019.01.034
- McIlroy SJ, Saunders AM, Albertsen M, Nierychlo M, McIlroy B, Hansen AA, Karst SM, Nielsen JL, Nielsen PH. (2015). MiDAS: the field guide to the microbes of activated sludge. *Database-Oxford*, doi:10.1093/database/bav062
- Monteiro S, Loftis S, Boxall ABA. (2010). Pre-assessment of environmental impact of zinc and copper used in animal nutrition. External scientific report. NP/FEEDAP/2008/01. 10.2903/sp.efsa.2010.EN-74
- Murray R, Tien YC, Scott A, Topp E. (2019). The impact of municipal sewage sludge stabilization processes on the abundance, field persistence, and transmission of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes to vegetables at harvest. *Sci Total Environ*, 651;1680. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.10.030
- Padilla-Benavides T, Long JE, Raimunda D, Sassetti CM, Arguello JM. (2013). A novel P(1B)-type Mn²⁺-transporting ATPase is required for secreted protein metallation in mycobacteria. *J Biol Chem*, 288;11334. doi:10.1074/jbc.M112.448175
- Posadas DM, Martin FA, Sabio y Garcia JV, Spera JM, Delpino MV, Baldi P, Campos E, Cravero SL, Zorreguieta A. (2007). The TolC homologue of *Brucella suis* is involved in resistance to antimicrobial compounds and virulence. *Infect Immun*, 75;379. doi:10.1128/IAI.01349-06
- Poulsen PHB, Magid J, Luxhøi J, de Neergaard A. (2013). Effects of fertilization with urban and agricultural organic wastes in a field trial – Waste imprint on soil microbial activity. 57;794. doi:10.1016/j.soilbio.2012.02.031
- Rahube TO, Marti R, Scott A, Tien YC, Murray R, Sabourin L, Zhang Y, Duenk P, Lapen DR, Topp E. (2014). Impact of fertilizing with raw or anaerobically digested sewage sludge on the abundance of antibiotic-resistant coliforms, antibiotic resistance genes, and pathogenic bacteria in soil and on vegetables at harvest. *Appl Environ Microbiol*, 80;6898. doi:10.1128/Aem.02389-14
- Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Sci Total Environ*, 447;345. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.01.032
- Rutgersson C, Ebmeyer S, Lassen SB, Karkman A, Fick J, Kristiansson E, Brandt KK, Flach C-F, Larsson DGJ. (2020). Long-term application of Swedish sewage sludge on farmland does not cause clear changes in the soil bacterial resistome. *Environ Int*, 137;105339. doi:10.1016/j.envint.2019.105339
- Song JX, Rensing C, Holm PE, Virta M, Brandt KK. (2017). Comparison of metals and tetracycline as selective agents for development of tetracycline resistant bacterial communities in agricultural soil. *Environ Sci Technol*, 51;3040. doi:10.1021/acs.est.6b05342
- Subbiah M, Mitchell SM, Ullman JL, Call DR. (2011). beta-lactams and florfenicol antibiotics remain bioactive in soils while ciprofloxacin, neomycin, and tetracycline are neutralized. *Appl Environ Microbiol*, 77;7255. doi:10.1128/AEM.05352-11
- Thelwell C, Robinson NJ, Turner-Cavet JS. (1998). An SmtB-like repressor from *Synechocystis* PCC 6803 regulates a zinc exporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95;10728. doi:10.1073/pnas.95.18.10728
-

-
- Tiwari RP, Reeve WG, Dilworth MJ, Glenn AR. (1996). An essential role for actA in acid tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Microbiology*, 142 (Pt 3);601. doi:10.1099/13500872-142-3-601
- Tom-Petersen A, Hosbond C, Nybroe O. (2001). Identification of copper-induced genes in *Pseudomonas fluorescens* and use of a reporter strain to monitor bioavailable copper in soil. *FEMS Microbiol Ecol*, 38;59. doi:10.1111/j.1574-6941.2001.tb00882.x
- Urrea J, Alkorta I, Mijangos I, Epelde L, Garbisu C. (2019). Application of sewage sludge to agricultural soil increases the abundance of antibiotic resistance genes without altering the composition of prokaryotic communities. *Sci Total Environ*, 647;1410. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.08.092
- van Schaik W. (2015). The human gut resistome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370;doi:10.1098/rstb.2014.0087
- VASYD. (2018). Miljörapport – Sjölanda reningsverk 2017. (In Swedish). <https://www.vasyd.se/-/media/Documents/Rapporter/Miljorapporter/2017/Miljrapport-2017-Sjlunda.pdf>
- Zhao Y, Cocerva T, Cox S, Tardif S, Su JQ, Zhu YG, Brandt KK. (2019). Evidence for co-selection of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in metal polluted urban soils. *Sci Total Environ*, 656;512. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.372
- Östman M, Lindberg RH, Fick J, Björn E, Tysklind M. (2017). Screening of biocides, metals and antibiotics in Swedish sewage sludge and wastewater. *Water Research*, 115;318. doi:10.1016/j.watres.2017.03.011

Svenskt Vatten

UTVECKLING

Svenskt Vatten Utveckling
Svenskt Vatten AB

POSTADRESS BOX 14057, 167 14 Bromma

BESÖKSADRESS Gustavslundsvägen 12, 167 51 Bromma

TELEFON 08-506 002 00

E-MAIL svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se