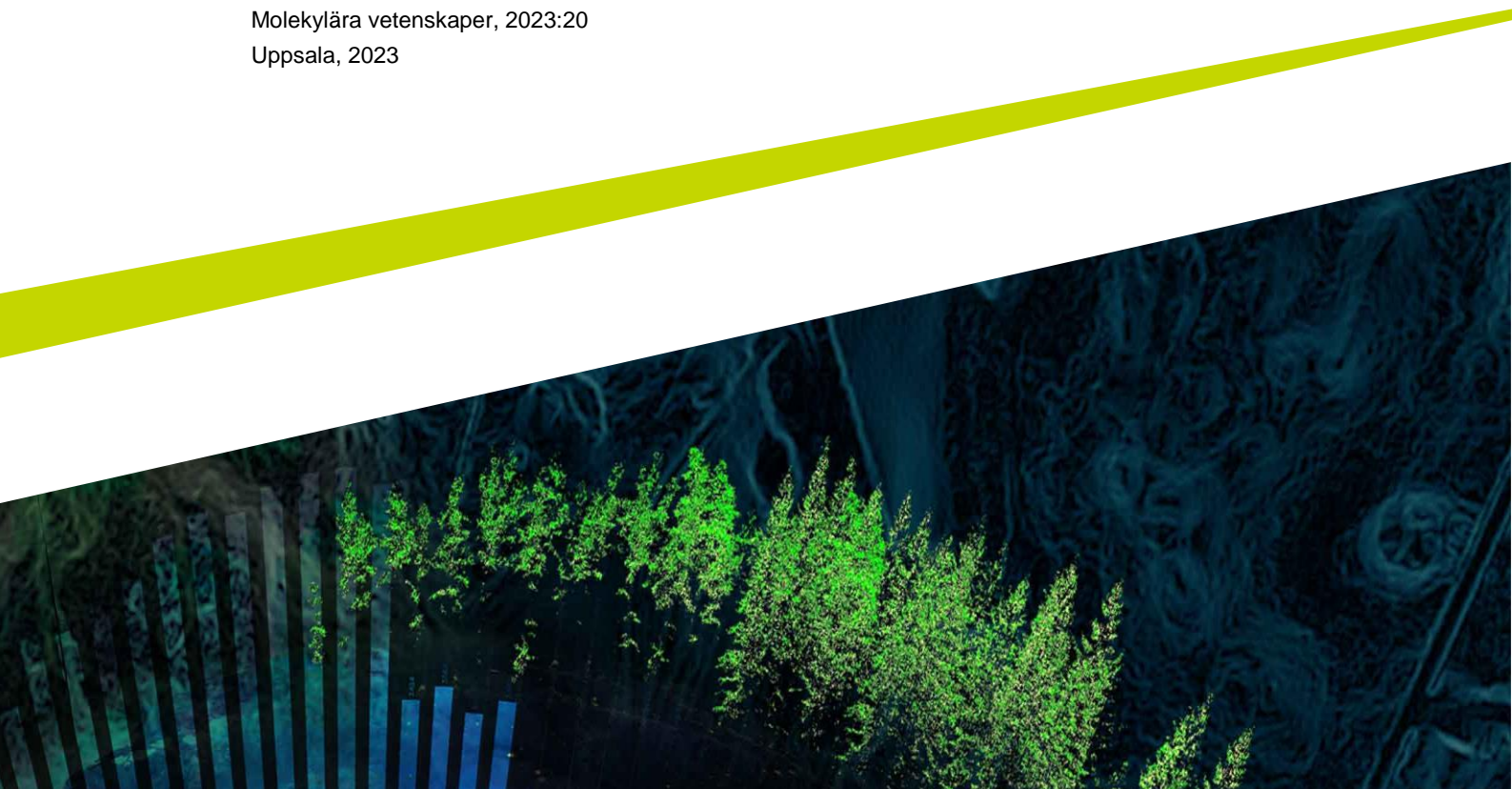




Kretslopp från avlopp: Enterokocker som indikatororganismer och bärare av Vankomycinresistens

Maja Berglind

Examensarbete/Självständigt arbete • 30 hp
Sveriges lantbruksuniversitet, SLU
Institution för energi och teknik
Agronomprogrammet – mark/växt
Molekylära vetenskaper, 2023:20
Uppsala, 2023



Kretslopp från avlopp: Enterokocker som indikatororganismer och bärare av Vankomycinresistens

Maja Berglind

Handledare: Annika Nordin, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för energi och teknik

Examinator: Maria Westerholm, Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för molekylära vetenskaper

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurstitel: Självständigt arbete i Biologi

Kurskod: EX0898

Program/utbildning: Agronomprogrammet – mark/växt

Kursansvarig inst.: Institutionen för Vatten och Miljö

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2023

Serietitel: Molekylära vetenskaper

Delnummer serien: 2023:20

Upphovsrätt: Alla bilder används med upphovspersonens tillstånd.

Nyckelord: *Enterococcus*, enterokocker, urea, *E. faecalis*, *E. faecium*, hygienisering, ureahygienisering, ammoniak, svartvatten, klosettatten, klosettavloppsvatten, avloppsvatten, antibiotikaresistens, Vankomycin, Vancomycin, CHROMagar, Slanetz-Bartley agar, indikatororganism

Sveriges lantbruksuniversitet

Fakulteten för naturresurser och jordbruksvetenskap (NJ)

Institutionen för energi och teknik

Sammanfattning

Tillförsel av växtnäring på åkermark är nödvändig för matproduktionen. En återförsel av mänskliga fekalier och urin via källsorterat toalettavfall (klosettavloppsvatten) ökar cirkulationen av näring, bidrar till förbättrad jordhälsa och minskar risken för övergödning i vattendrag. Antibiotikaresistenta bakterier och andra patogener förekommer i mänsklig avföring då människor är sjuka. Därför finns en potentiell risk med användningen av klosettavloppsvatten som gödningsmedel, då det skulle kunna innebära att antibiotikaresistenta bakterier och andra patogener sprids i naturen.

Inom *Enterococcus* spp. finns arter som bär på resistens mot bland annat antibiotikumet Vankomycin. Ett sätt att förhindra spridning av bland annat antibiotikaresistenta bakterier är om klosettavloppsvattnet hygieniseras innan det används som gödsel. Enterokocker är ett släkte av bakterier som används som indikatororganismer för att kontrollera hygieniseringsmetoders effekt. En hygieniseringsmetod är att tillsätta urea till klosettavloppsvattnet, vilket via enzymet ureas bryts ned till NH_3 som är toxiskt för mikroorganismer. *Enterococcus* spp. värde som indikatororganismer vid ureahygienisering har diskuterats, då det förekommer arter med hög tålighet mot NH_3 .

I detta arbete undersöktes enterokockers förekomst i avloppsvatten och klosettavloppsvatten, hur många av dem som bar på vankomycinresistens, om skillnad i avdödningshastighet föreligger mellan olika enterokocker vid ureahygienisering 1% i 14°C, samt så diskuterades enterokockers värde som indikatororganismer. Odlingsmediet som användes främst var VRE-agar med och utan tillsatt Vankomycin, men det gjordes även en jämförelse med SlaBa. Vid ureahygieniseringen följdes isolat av kända stammar och stammar isolerade ur avloppsvatten vilka tillsattes i autoklaverat klosettavloppsvatten, samt naturligt förekommande stammar av enterokocker i klosettavloppsvatten och avloppsvatten.

Resultaten visade att enterokocker förekommer med 45 838 cfu/ml avloppsvatten, varav 0,24% bar på resistens mot Vankomycin. En jämförelse med tidigare studier indikerar att andelen Vankomycinresistenta enterokocker kan ha ökat i avloppsvattnet i Uppsala sedan 2002. I klosettavloppsvattnet förekom enterokocker med 9828 cfu/ml, inga Vankomycinresistenta bakterier detekterades. Den lägre koncentrationen av enterokocker i klosettavloppsvatten beror förmodligen på att klosettavloppsvattnet hade lagrats >5 månader innan analys, vilket kan minska bakteriekoncentrationen.

I slutet på ureahygieniseringen fanns skillnad i koncentrationen NH_3 i provlösningarna. Skillnaden påverkades främst av andelen nedbruten urea, samt lösningens pH-värde. Skillnaden berodde på att lösningarna med autoklaverat klosettavloppsvatten inte hade naturligt förekommande ureas.

En stam av *E. faecalis* hade signifikant snabbare inaktivering under försökstiden jämfört med de andra enterokockerna, trots att det fanns två andra stammar av *E. faecalis*. Det skilde 33 dagar för 5 \log_{10} reduktion mellan den snabbaste och långsammaste stammen av *E. faecalis*. Skillnaden i inaktiveringstid kan påverka *E. faecalis* värde som indikatororganism.

Det krävdes 88 dagar för att nå 5 \log_{10} reduktion vid ureabehandling 1% i 14°C för samtliga undersökta enterokocker i denna studie.

Inga stammar av enterokocker med icke-fekalt ursprung användes i denna studie. För att undersöka *Enterococcus* spp. värde som indikatororganismer skulle stammar av icke-fekalt ursprung behöva användas, då skillnader i ammoniak känslighet eventuellt kan skilja sig mellan fekala och icke-fekala enterokocker.

Nyckelord: *Enterococcus*, enterokocker, *E. faecalis*, *E. faecium*, urea, hygienisering, ammoniak, svartvatten, klosettavloppsvatten, klosettavloppsvatten, avloppsvatten, antibiotikaresistens, Vankomycin, CHROMagar, Slanetz-Bartley agar, indikatororganism

Abstract

Fertilizing arable land is necessary for food production. Using source separated toilet waste (blackwater) as fertilizer increases the circulation of nutrients, it contributes to improved soil health and reduces the risk of eutrophication. Antibiotic-resistant bacteria and other pathogens occurs in human feces when people are sick. Thus, there is a potential risk with re-circulating blackwater as fertilizer, as it could lead to spreading of antibiotic-resistant bacteria and other pathogens in nature.

Within *Enterococcus* spp. there are species that are resistant to the antibiotic Vancomycin. One way to prevent the spread of antibiotic-resistant bacteria and pathogens in nature is if the blackwater is sanitized before it is used as fertilizer. Enterococci is a genus of bacteria that is often used as an indicator organism to control the effect of sanitation methods. One sanitizing method is to add urea to blackwater. Urea breaks down by the enzyme urease into NH_3 , which is toxic to microorganisms. The value of *Enterococcus* spp. as indicator organisms in urea sanitation has been discussed, as there are species with a high tolerance to NH_3 .

In this study the presence of enterococci in sewer water and blackwater was investigated, how many of them that had vancomycin resistance, whether there is a difference in the killing rate between enterococci with urea sanitization 1% in 14°C. Also, the value of enterococci as indicator organisms was discussed. The culture medium used in this study was mainly VRE agar with and without added Vancomycin, but a comparison was also made with SlaBa. The inactivation of enterococci in following solutions was analyzed during the urea sanitation: isolates of known strains of enterococci, and strains isolated from sewer water were added to autoclaved blackwater, as well as naturally occurring strains of enterococci in untreated blackwater and sewer water.

The results showed that enterococci occur with 45,838 cfu/ml of sewer water, of which 0.24% were resistant to Vancomycin. A comparison with previous studies indicates that the proportion of vancomycin-resistant enterococci may have increased in sewer water in Uppsala since 2002. Enterococci occurred with 9828 cfu/ml in blackwater. No Vancomycin-resistant bacteria were detected in blackwater at detection level 1cfu/ml. The lower concentration of enterococci in blackwater is probably because it had been stored for >5 months before analysis, which may reduce the bacterial concentration.

At the end of the urea sanitation, the concentration of NH_3 in the investigated solutions differed. The difference was mainly affected by the proportion of dissolved urea, as well as the pH value of the solution. The autoclaved blackwater solutions did not have naturally occurring urease, due to the autoclavation, which probably explain the differences.

One strain of *E. faecalis* had significantly faster inactivation over the trial period compared to the other enterococci, even though there was two other strains of *E. faecalis* in the study. It differed 33 days for 5 log₁₀ reduction between the fastest and slowest strain of *E. faecalis*. The difference in inactivation time may affect the value of *E. faecalis* as an indicator organism.

It took 88 days to reach 5 log₁₀ reduction with urea treatment 1% in 14°C for all strains of enterococci analyzed in this study.

This study did not include any strain of enterococci of non-fecal origin. To investigate the value of *Enterococcus* spp. as indicator organism, strains of non-fecal origin would need to be used, as differences in ammonia sensitivity may differ between fecal and non-fecal enterococci.

Keywords: *Enterococcus* spp., enterococci, urea, sanitization, ammonia, blackwater, sewer water, wastewater, antibiotic resistance, Vancomycin, CHROMagar, Slanetz-Bartley agar, indicator organism

Innehållsförteckning

Tabellförteckning	7
Figurförteckning.....	9
Förkortningar	11
1. Inledning	12
2. Syfte och frågeställningar	14
3. Bakgrund	15
3.1 Antibiotikaresistens	15
3.1.1 Mekanismer för resistensspridning.....	15
3.1.2 Spridning av antibiotikaresistenta bakterier med mänskligt ursprung i miljön	
16	
3.2 Ammoniakhygienisering.....	16
3.2.1 Urea	18
3.2.2 Flytande ammoniak	18
3.3 Indikatororganismer	18
3.4 Enterokocker.....	19
3.4.1 Enterokocker som patogener.....	20
3.4.2 Vankomycinresistens.....	20
3.4.3 Ammoniakhygienisering av enterokocker.....	21
3.4.4 Enterokocker som indikatororganismer.....	22
3.4.5 Odlingsmedium för enterokocker.....	22
4. Material och metod	24
4.1 Material och metod som användes i båda delarna av arbetet.....	24
4.1.1 Avlopps- och klosettavloppsvatten	24
4.1.2 Odlingsmedium vid koncentrationsbestämning	24
4.1.3 Spädningsserier för koncentrationsbestämning av enterokocker	25
4.2 Del 1: Förekomst av enterokocker i blandat avloppsvatten samt klosettavloppsvatten	25
4.2.1 Isolering av stammar	26
4.2.2 Metodutveckling.....	27

4.3	Del 2: Olika enterokockers inaktiveringshastighet vid ureabehandling	27
4.3.1	Flödesschema vid tillverkning av provlösningar	29
4.3.2	Beräkning av kemiska parametrar	30
4.4	Statistiska analyser	30
5.	Resultat	32
5.1	Metodutveckling	32
5.1.1	SlaBa-agar med tillsatt Vankomycin	32
5.1.2	Jämförelse av enterokockkoncentration på SlaBa och VRE-	32
5.1.3	Överföring av kolonier med filter	33
5.1.4	Typer av kolonier på VRE-agar	33
5.1.5	Minskad selektivitet med 48 timmars inkubering av VRE-agar	34
5.2	Isolering av stammar från avloppsvatten	35
5.3	Enterokocker i avloppsvatten	36
5.4	Enterokocker i klosettavloppsvatten	38
5.5	Ureahygienisering	39
5.5.1	Ammoniak, pH och elektrisk konduktivitet	39
5.5.2	Inaktivering av enterokocker	41
6.	Diskussion	45
6.1	Enterokocker i avlopp	45
6.1.1	SlaBa ger bättre selektivitet än VRE- för analys av avlopp	45
6.1.2	Vankomycinresistenta enterokocker förekommer i avlopp	45
6.2	Ureahygienisering	46
6.2.1	Skillnad i inaktiveringsmönster kan påverka <i>E. faecalis</i> värde som indikatororganismer	46
6.2.2	Hygieniseringsmönster	47
6.2.3	pH och andel nedbruten urea påverkade koncentrationen av NH ₃	48
7.	Slutsats	50
	Referenser	51
	Populärvetenskaplig sammanfattning	56
	Tack	57
	Bilaga 1	58
8.	Bilaga 2	60
9.	Bilaga 3	63
10.	Bilaga 4	65

Tabellförteckning

Tabell 1. Andel ammoniak (%) i form av NH ₃ vid olika kombinationer av temperatur och pH. Värden hämtade från Nordin (2018), som beräknade enligt Emerson et al. (1975). NH ₃ är toxiskt för mikroorganismer, därför ökar hygieniseringseffekten med en ökad andel NH ₃	17
Tabell 2. Arabinostest kan användas för att differentiera arter av enterokocker då de har olika förmåga att hydrolysera arabinos. Gul = hydrolys av arabinos, röd = ingen hydrolys av arabinos (Manero & Blanch, 1999).....	23
Tabell 3. Kända stammar av bakterier som användes för kontroll av nytillverkad agar samt vid biokemiska tester	25
Tabell 4. Biokemiska tester som användes för konfirmering- samt differentiering av enterokockstammar isolerade från avloppsvatten i del 1 av arbetet	27
Tabell 5. Material och tillsatta stammar av enterokocker vid ureahygeniseringen	28
Tabell 6. Tidpunkter i försöket för koncentrationsbestämning av enterokocker, samt mätning av kemiska parametrar	28
Tabell 7. Startparametrar och värden för metod som användes i regressionsberäkning av inaktiveringsmönstret	30
Tabell 8. Enterokocker i log ₁₀ cfu per ml avloppsvatten vid odling på SlaBa. Avloppsvatten från prov A, B och C odlades i triplikat.....	32
Tabell 9. Esculinhydrolys för kolonier som inkuberats i 24 och 48 timmar på VRE+.....	35
Tabell 10. Fördelning av enterokocker med och utan vankomycinresistens i avloppsvatten givet som koncentration (log ₁₀ cfu/ml) och som procent av totala koncentrationen enterokocker. Då koncentrationerna inte var signifikant skilda mellan provtagningstillfällena ges medelvärde för alla provtagningarna	36
Tabell 11. Jämförelse av koncentrationen av enterokocker mellan provdatumen i ANOVA envägstest visade ingen signifikant skillnad. p>0,05 = ingen signifikant skillnad	37
Tabell 12. Medelvärdet av enterokockkoncentrationen i klosettatten	38

Tabell 13. Mätningar från dag 0. mM av NH-N efter tillsatt urea är teoretiskt beräknad. pH och EC för autoklaverat avloppsvatten efter tillsatt urea är medelvärden från provlösning F-J, se bilaga 3 för rådata	39
Tabell 14. Mätningar från dag 33	39
Tabell 15. Beräknade värden baserade på medelvärdena av mätningarna dag 33 (tabell 14).....	40
Tabell 16. Signifikansgrupper från ANOVA envägstest med avseende på ammoniak N g/l. Signifikant skillnad föreligger mellan provlösningarna då stammarna tillhör olika grupper.....	40
Tabell 17. Koncentrationerna av enterokocker i provlösningarna vid försökets uppstart samt avslut. Den totala reduktionen anges i logaritmerat värde	43
Tabell 18. Inaktiveringsparametrar för de olika enterokockerna (naturligt förekommande i avlopp (D) och klosettatten (E), och enskilda stammar tillsatta till autoklaverat klosettatten (F-J)) där k är inaktiveringshastighetskonstanten och lagtid tid innan inaktiveringen påbörjas som en funktion av konstanten n och k (n/-k). Inaktiveringsparametrarna (Tabell 6) från regressionsanalys med data för alla triplikaten varians för n och k anges som standard felet (SE). SSE (residualkvadratsumman) baseras på hela funktionen och anger hur väl regressionslinjen är anpassad. Ett lågt värde indikerar för en bättre anpassad kurva än ett högt värde. Tiden för en 5 log ₁₀ reduktion är beräknad från dag 0	43

Figurförteckning

- Figur 1. Esculinagar med tillväxt av enterokocker vilka ger svart fällning i vänstra delen av agarplattan. Ingen bakterietillväxt eller nedbrytning av esculin på högra halvan av agarplattan 23
- Figur 2. Kolonibildning av anrikade enterokocker från avloppsvattenprov A på VRE-agar med Vankomycin. Plattorna till vänster är från anrikning av 1 ml och plattorna till höger är från anrikning 10 ml 26
- Figur 3. Tillväxt av kolonier på VRE-agar från SlaBa agar (båda agarna utan Vankomycin). *E. faecalis* och *E. faecium* förväntas ge rosa till lila kolonier och andra arter av enterokocker blåa kolonier. Ingen konfirmation av enterokocker utfördes för dessa plattor 33
- Figur 4. Foto av avloppsvatten på VRE-agar med Vankomycin (+) och VRE-agar utan Vankomycin (-) efter inkubering 24 h (till vänster) och 48 h (till höger) i 37°C. Plattorna högst upp i bild är spädda 10^{-1} , följt av spädningsarna 10^{-2} , 10^{-3} och 10^{-4} i fallande ordning 34
- Figur 5. Stammarna av enterokocker som isolerades ur avloppsvattnet i del 1 av arbetet, samt de kända stammarna av enterokocker som användes i del 2 av arbetet kontrollerades med L-arabinostest (Rosco Diagnostica). Färgomslag från rött till gult visar på förmåga att hydrolysera arabinos. Nr1: *E. faecalis* 12697. Nr2: *E. faecium* NCTC 122042. Nr3: blå enterokock från VRE-. Nr4: *E. faecalis* ATCC 29212. Nr5: rosa enterokock från VRE-. Längst till vänster i bild är en negativ kontroll som enbart innehöll fysiologisk saltlösning 36
- Figur 6. Vankomycinkänsliga Enterokocker i avloppsvatten. Felstaplar visar standardavvikelsen för medelvärdet 37
- Figur 7. Vankomycinresistenta Enterokocker i avloppsvatten. Felstaplar visar standardavvikelsen för medelvärdet 38
- Figur 8. Linjerna visar elektrisk konduktivitet som bör korrelera med andelen nedbruten urea, prickarna visar pH-värden. Notera att skalan för elektrisk konduktivitet ligger till vänster och skalan för pH till höger i diagrammet. Felstaplarna visar standardavvikelsen av medelvärdet 41

Figur 9. Reduktionen av enterokocker som en \log_{10} förändring från startvärdet. Punkterna i diagrammet motsvarar medelvärden av mätningar vid de olika tidpunkterna i försöket. Regressionsmodellerna baseras på Ekvation 6 med parametrar enligt tabell 18 42

Förkortningar

VRE-	CHROMagar™ VRE agar utan tillsatt Vankomycin
VRE+	CHROMagar™ agar med tillsatt Vankomycin
SlBa	Slanetz-Bartley agar
cfu	Colony forming units – antal bakteriekolonier
EC	Elektrisk konduktivitet
SD	Standardavvikelse
m	Medelvärde
SE	Standardfel
SSE	Residualkvadratsumma
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
spp.	Underarter
Klosettwater	Klosettavloppsvatten (tidigare kallat för svartwater)
Avloppsvatten	Blandat avloppsvatten

1. Inledning

Odling av livsmedel kräver varje år stora mängder gödsel för att ge avkastning (SCB 2020). Det främst begränsande växtnäringsämnet är kväve, följt av fosfor, kalium och ett flertal makro- och mikronäringsämnen (Nationalencyklopedin u.å.d). Den största andelen gödsel som används för att täcka upp växtbehovet i Sverige tillsätts idag via mineralgödsel. Kväve i mineralgödsel framställs via en energikrävande process där kväve binds från atmosfären. Energikällan för utvinning av kväve kommer främst från naturgas, men även från eldning av kol och olja (Jönsson 2019). Fosfor som används som gödselmedel utvinns främst ur gruvor och är därmed en ändlig resurs, som också kräver energi i utvinningsprocessen (de Boer et al. 2019). Användningen av mineralgödsel tillför stora mängder ny näring till jordarna varje år, vilket ökar risken för övergödning av bland annat Östersjön (Johansson et al. 2021).

Ett sätt att minska inflödet av ny växtnäring och få en mer cirkulär växtnäringskedja är att återföra mänsklig urin och fekalier som gödsel på åkrar (Johansson et al. 2021). Fekalier och urin är rikt på kväve och fosfor, men innehåller även kalium, mikronäringsämnen och svårnedbrutna organiska material. Tillsammans innehåller de för växterna alla nödvändiga växtnäringsämnen (Jönsson et al. 2004). Tillförandet av organiskt material ökar dessutom kolhalten i jorden, vilket bidrar till ett rikare mikroliv och förbättrad jordhälsa (Edmeades 2003; Jönsson et al. 2004).

Dagens avloppssystem innebär att klosettavloppsvattnet, det vill säga toalettpapper, urin, fekalier och spolvatten, späds ut med stora mängder gråvatten och blandas med andra avloppsfraktioner som kan innehålla tungmetaller. Blandat avloppsvatten innehåller därmed fraktioner som inte är önskvärda att sprida på åkermark. Gråvatten är avloppsvatten från till exempel kök, dusch och tvätt i hushållen. Tungmetaller kommer bland annat från spillvatten från industrier samt dagvatten (Sörme & Lagerkvist 2002; Svenskt Vatten 2022). En lösning för att minska problemen med stora vattenmängder och toxiska ämnen är att källsortera klosettavloppsvattnet. Näringen i källsorterat klosettavloppsvatten skulle kunna ersätta mineralgödselanvändningen med ca 20-30% i Sverige (Winker et al. 2009; Johansson et al. 2021).

En nackdel med användning av mänsklig avföring som gödselmedel på åkermark är risken att sprida och cirkulera patogener (Naturvårdsverket 2013). Idag

finns inga krav i Sverige på hygienisering av avloppsfraktioner innan de sprids på åkermark. Naturvårdsverket (2013) rekommenderar att sådana krav bör införas.

Ett sätt att mäta olika hygieniseringsmetoders effektivitet är att använda sig av indikatororganismer som förekommer naturligt i materialet. Bakterier av släktet enterokocker används som indikatorer på behandlingseffekt men även fekal förorening. Enterokocker har ursprung från olika miljöer, men då avloppsfraktioner ska hygieniseras är det främst *Enterococcus faecalis* och *Enterococcus faecium* vilka har fekalt ursprung som är relevanta. *E. faecalis* och *E. faecium* utgör del av den normala tarmfloran men verkar som patogener om de hamnar på andra platser i kroppen, dessutom förekommer vankomycinresistens vilket skapar incitament för att minska förekomsten av enterokocker innan avloppsfraktionerna sprids på åkermark. I detta arbete undersöks enterokockers förekomst i avloppsvatten, hur många av dem som bär på vankomycinresistens, om skillnad i avdödningshastighet föreligger mellan olika arter och stammar av enterokocker vid ureahygienisering, samt så diskuteras enterokockers värde som indikatororganismer.

2. Syfte och frågeställningar

I detta mastersarbete studeras enterokocker i avlopp, samt så diskuteras enterokockers värde som indikatororganismer. För att samla grundläggande information om enterokocker i avlopp undersöks följande:

- Av de enterokocker som återfinns i klosettavloppsvatten/blandat avloppsvatten hur stor del utgörs av *E. faecalis* och *E. faecium*?
- Hur stor del av *Enterococcus* spp. i klosettavloppsvatten/blandat avloppsvatten är resistent mot Vankomycin?

För att bedöma deras värde som indikatororganismer undersöks följande:

- Är *E. faecalis* och *E. faecium* mer alternativt mindre tåligt mot ammoniakhygienisering än andra enterokocker?

3. Bakgrund

3.1 Antibiotikaresistens

Antibiotikaresistenta bakterier är idag ett av de största vårdrelaterade problemen globalt sett (Folkhälsomyndigheten 2014; WHO 2020). Felaktig- samt överdriven användning av antibiotika hos människor och djur är en starkt bidragande orsak till ökningen av antibiotikaresistenta bakterier (Holmes et al. 2016; WHO 2020).

Bakterier har en evolutionär förmåga att genom spontana mutationer utveckla skyddsmekanismer mot hot och konkurrenter i dess närmiljö, där de bakterier som utvecklat skyddsmekanismer har en fördel gentemot andra mikroorganismer. Skyddsmekanismerna innebär bland annat att en del bakterier utvecklar resistens mot antibiotika. I miljöer som är rika på antibiotika, till exempel i mag-tarmkanalen hos en människa som medicineras med antibiotika, är selektionstrycket högt och därmed främjas tillväxten av antibiotikaresistenta bakterier. Ämnen som förekommer i antibiotikum framställs både industriellt samt produceras i naturen av svampar och bakterier, därför förekommer antibiotikaresistenta bakterier även i miljöer som ej utsatts för mänskligt tillverkat antibiotika (Holmes et al. 2016).

En del gener som kodar för antibiotikaresistens förekommer hos flera släkten av bakterier, vilket gör att bakterier kan sprida resistensgener både inom- och till bakterier utanför sitt släkte. Ett exempel på detta är att genen *vanA* som kodar för vankomycinresistens hos *Enterococcus faecium*, har identifierats hos patienter infekterade med bakterien *Staphylococcus aureus* som även bär på resistens mot antibiotikan Meticillin (Weigel et al. 2003; Willems et al. 2005). Studier har visat att gener för vankomycinresistens kan föras över från *Enterococcus faecalis* till *Staphylococcus aureus* in vivo och in vitro (Noble et al. 1992)

3.1.1 Mekanismer för resistensspridning

Gener kan spridas mellan bakterier på tre sätt: transduktion, transformation och konjugation. Konjugation är den metod som främst används för spridning av antibiotikaresistenta gener mellan bakterier (Davies & Davies 2010; Zrimec & Lapanje 2018)..

Konjugation är när bakterier för över DNA mellan sig. Det DNA som förs över är i form av en eller flera plasmider. Plasmider är fria cirkelformade DNA-strängar som förekommer hos bakterier, som inte sitter på kromosomerna (Nationalencyklopedin u.å.b). För att konjugation ska kunna ske krävs det att plasmiden innehåller gener som gör konjugation möjligt. Givarbakterien kan föröka plasmiden internt, och för över en kopia av plasmiden via en pilus till en mottagarbakterie som förvärvar genernas egenskaper (Nationalencyklopedin u.å.a).

3.1.2 Spridning av antibiotikaresistenta bakterier med mänskligt ursprung i miljön

Bakterier som har utvecklat antibiotikaresistens förekommer bland annat i fekalier från människor (Naturvårdsverket 2013; Özsoy & İlki 2017). Därmed finns det risk att gener för antibiotikaresistens sprids till miljön då fekalier används som gödselmedel på åkrar (Sahlström et al. 2009). Det finns studier som visar på korrelation mellan förekomsten av fekal förorening och ett ökat antal gener för antibiotikaresistens i markprov (Karkman et al. 2019). Korrelationen skulle kunna bero på att fekalier i sig självt innehåller gener för antibiotikaresistenta bakterier, och att den ökade andelen resistenta gener i markproverna enbart beror på rester av fekalier och fekala bakterier (Karkman et al. 2019; Rutgersson et al. 2020).

Utöver gödsling med källsorterat klosettavloppsvatten kan fekalier även spridas i miljön via gödsling med slam, vilket är en restprodukt från reningen av blandat avloppsvatten (Gryaab u.å.). I en svensk studie undersöktes ett fältförsök som har gödslats med upp till 12 ton avloppsslam per hektar vart 4:e år sedan 1981. Studien visade bland annat att gödsling med slam inte orsakade en anrikning av antibiotikaresistenta bakterier eller gener för antibiotikaresistens (Rutgersson et al. 2020). En annan studie där avloppsslam som gödsling på åkermark undersökts i Kina (Chen et al. 2016) visades vid höga doser med gödsling en ökad förekomst och diversitet av bakteriella antibiotikaresistensgener samt antibiotikaresistenta bakterier. Slamdosen rekommenderades därför att hållas $\leq 4,5$ ton per hektar och år (Chen et al. 2016). Användningen av antibiotika, utbredningen av antibiotikaresistens och hygienisering av avloppsslam ser olika ut i olika länder, därför skulle gödsling med avloppsslam kunna ha olika konsekvenser i olika länder (Rutgersson et al. 2020).

3.2 Ammoniakhygienisering

Ammoniak (NH_3) kan användas för kemisk hygienisering av patogener i klosettavloppsvatten då det är toxiskt för mikroorganismer i höga doser. Ammoniak i lösning (NH_3) är i jämvikt med den korresponderande jonen ammonium (NH_4^+). Hur jämvikten är fördelad mellan formerna avgörs av substratets pH, och av

temperatur (ekvation 1). Med information om substratets temperatur och pH går det att beräkna fraktionen av NH_3 (ekvation 2). Ett högt pH kombinerat med en hög temperatur ger en hög andel ammoniak (tabell 1). För den sanerande effekten är det viktigt att koncentrationen ammoniak är tillräckligt hög, då mikroorganismer överlever även vid höga halter av den korresponderande jonen ammonium (NH_4^+) (Nordin 2010).

$$\text{Ekvation 1} \quad pK_a = \frac{2728,92}{(273,15+T)} + 0,090181$$

$$\text{Ekvation 2} \quad f_{\text{NH}_3} = \frac{1}{(10^{pK_a - \text{pH}}) + 1}$$

Tabell 1. Andel ammoniak (%) i form av NH_3 vid olika kombinationer av temperatur och pH. Värden hämtade från Nordin (2018), som beräknade enligt Emerson et al. (1975). NH_3 är toxiskt för mikroorganismer, därför ökar hygieniseringseffekten med en ökad andel NH_3

	pH								NH_3 (%)	
	7,5	8	8,5	9	9,5	10	10,5	11		
Temperatur (°C)	50	8,4	22	48	74	90	97	99	100	90–100
	45	6,3	18	40	68	87	96	99	100	80–90
	40	4,7	13	33	61	83	94	98	99	70–80
	35	3,4	10	26	53	78	92	97	99	60–70
	30	2,5	7,4	20	45	72	89	96	99	50–60
	25	1,8	5,4	15	36	64	85	95	98	40–50
	20	1,2	3,8	11	28	56	80	93	98	30–40
	15	0,9	2,7	7,9	21	46	73	90	96	20–30
	10	0,6	1,8	5,5	16	37	65	85	95	10–20
	5	0,4	1,2	3,8	11	28	55	80	93	0–10

Ammoniak förekommer naturligt i klosettavloppsvatten främst via urin, men är vid vanliga vattenspolade toaletter så utspädd att tillsatser krävs för att få en koncentration som verkar bakteriedödande. Det kan ske via kemiska tillsatser som urea eller flytande ammoniak. Det går även att tillföra mer ammoniak via utspädd urin från källsorterande toaletter (Nordin 2010).

Genom tillförande av ammoniak höjs pH-värdet, men avdödningen av bakterier beror främst på förekomsten av ammoniak i gasform (NH_3) vilken är löst i klosettvattnet. Då ammoniak är en gas sker det kväveförluster om klosettavloppsvatten förvaras och behandlas i öppna behållare, vilket därmed försämrar hygieniseringseffekten. Vid en lufttät miljö förhindras ammoniakavgång, i stället skapas en jämvikt mellan ammoniakgasen ovanför ytan och ammoniakgasen löst i klosettvattnet. En lufttät behandling är mycket viktigt för att bibehålla ammoniakkoncentrationen i vattnet och därmed hygieniseringsförmågan (Nordin 2010). Andra fördelar med en lufttät miljö där koncentrationen av NH_3 bibehålls i klosettvattnet, är att det inte sker någon bakteriell tillväxt på grund av NH_3 toxiska egenskaper. Därför kan det behandlade klosettvattnet förvaras utan

risk för patogen återväxt i väntan på spridning på åkermark. Dessutom blir miljön toxisk för icke-patogena mikrober så som metanbildande bakterier, därför uteblir produktionen av växthusgaser under behandlingen (Nordin 2018).

Då klosettvattnen behandlas med ammoniak som hygieniseringsmetod i en sluten behållare får slutprodukten en hög andel kväve i förhållande till kalium och fosfor. Om slutprodukten ska användas som gödning på åkermark bör gödselgivan anpassas efter grödans kvävebehov (Winker et al. 2009).

3.2.1 Urea

Urea ($\text{CO}_2(\text{NH}_2)_2$) är ett syntetiskt urinämne som framställs industriellt med ammoniak och koldioxid. Urea produceras till lukt- och färglösa kristaller och används vanligtvis som gödningsmedel i jordbruk (Nationalencyklopedin u.å.c). I en klosettvattnelösning bryts urea ned till ammoniak och karbonat (HCO_3^-) via enzymet ureas som produceras av bakterier i fekalierna. För att urean ska fördelas i materialet och brytas ned behövs anpassade metoder för inblandning och omrörning av lösningen. Vid en effektiv behandling stabiliseras pH omkring 9, vilket förklaras av de buffrande karbonatjonerna (Nordin 2018).

Konduktiviteten i en lösning ökar med ett ökat innehåll av lösta joner. Mätning av elektrisk konduktivitet är en metod för att undersöka om urean bryts ned i en lösning (Ray et al. 2017).

3.2.2 Flytande ammoniak

Flytande ammoniak i klosettvattnen ger $\text{pH} > 10$. Det höga pH-värdet bidrar till en effektiv användning av kvävet då en stor andel förekommer som ammoniak. Därmed ger flytande ammoniak en billigare hygieniseringsbehandling jämfört med urea. Nackdelen är att flytande ammoniak har en stark doft och ångor som är skadliga för människor, vilket kan skapa arbetsmiljömässiga problem vid tillsatsen (Nordin 2018).

3.3 Indikatororganismer

Vid hygienisering av till exempel avloppsfraktioner och vid behandling av dricksvatten vill man säkerställa att det i det behandlade materialet inte förekommer halter av patogener som kan göra människor och djur sjuka. Då stora volymer ska behandlas är det inte möjligt att enskilt mäta alla patogener som eventuellt förekommer. I stället används indikatororganismer, vilka naturligt förekommer i höga halter i det material som ska undersökas.

Indikatororganismer bör komma från samma ursprungskälla, ha samma effekt vid hygieniseringsprocesser samt ha samma överlevnadsmönster i miljön som de patogener de indikerar för (Bäckström et al. 2013). Indikatororganismer ska helst

vara icke-patogena och vara lätta att upptäcka även i låga koncentrationer. Koncentrationen av indikatororganismen i det undersökta materialet bör vara högre än koncentrationen av den patogen indikatororganismen indikerar för (Motlagh & Yang 2019).

Två indikatororganismer som används ofta för att undersöka förekomsten av patogener från fekal kontaminering och för att utvärdera behandlingseffekt är *Escherichia coli* och *Enterococcus faecalis* (Nordin 2018; Motlagh & Yang 2019).

3.4 Enterokocker

Morfologiska likheter bland alla underarter av släktet *Enterococcus* är att samtliga har sfäriska, alternativt äggformade celler som är formerade i kedjor eller par. Alla enterokocker är grampositiva, fakultativt anaeroba kemoorganotrofer. Enterokocker kan föröka sig i temperaturer mellan 10 och 45°C, medianoptimal tillväxt sker vid 35°C (Lebreton et al. 2014).

Enterokocker är en del av människans naturliga bakterieflora och förekommer i munhåla, genitalier, samt mag-tarmkanalen (Folkhälsomyndigheten 2014). De utgör normalt upp till ca 1% av bakteriefloran i mag-tarmkanalen hos människor och består då främst av *E. faecalis* och *E. faecium* (Sghir et al. 2000; Lebreton et al. 2014; Tedim et al. 2015). Även andra arter av enterokocker har identifierats i mänskliga fekalier, bland andra *E. avium*, *E. hirae*, *E. raffinosus* och *E. gallinarum* (Tedim et al. 2015).

Tidigare svenska undersökningar har visat att intestinala enterokocker förekommer med ca 1000 cfu/ml vatten i inkommande avloppsvatten till ett kommunalt reningsverk i Jönköping (Bäckström et al. 2015), 1000 till 10 000 cfu/ml inkommande avloppsvatten på reningsverk i Uppsala och Stockholm (Iversen et al. 2002), samt med ca 1200 cfu/ml vatten i klosettavloppsvatten från Bälinge som fraktades till- och sedan provtogs på Sjöstadverket (Andersson & Castor 2005). Studien som gjordes på inkommande avloppsvatten på reningsverk i Stockholm och Uppsala visade att vankomycinresistenta enterokocker förekom med <100 cfu/100 ml avloppsvatten (Iversen et al. 2002). Idag (år 2023) förekommer inget krav på rening av enterokocker vid återanvändning av avloppsvatten i EU (FAO 2022).

Förutom hos människor förekommer enterokocker i mag-tarmkanalen hos ett flertal däggdjur, reptiler, fåglar och insekter. Enterokocker kan även hittas i andra miljöer, så som i vattendrag, i livsmedel, jord, vatten och i växter (Lebreton et al. 2014).

3.4.1 Enterokocker som patogener

Enterokocker är en del av människans mag-tarmflora, men om de hamnar någon annanstans i människans kropp så kan de vara patogena (Region Stockholm 2018). Som patogen orsakar de vanligtvis infektioner i sårskador eller urinvägsinfektioner. Enterokocker kan även ge upphov till svårare sjukdomar, som blodförgiftning samt endokardit, vilket är en infektion i hjärtklaffarna (Folkhälsomyndigheten 2014).

Det förekommer antibiotikaresistens hos enterokocker, bland annat mot det brett verkande antibiotikumet Vankomycin som vid vissa typer av infektioner är det enda alternativet för behandling (Folkhälsomyndigheten 2014). I Sverige måste fall med vankomycinresistenta enterokocker anmälas enligt smittskyddslagen (SFS 2004:168). En del stammar av enterokocker har även resistens mot antibiotikumet Teicoplanin (Hegstad et al. 2010). En metastudie från 2005 visar att mortaliteten hos patienter med blodförgiftning är högre vid infektion av vankomycinresistenta enterokocker, jämfört med personer infekterade med enterokocker som är känsliga för Vankomycin (DiazGranados et al. 2005). Cirka en av tio som blir infekterade med vankomycinresistenta enterokocker får sjukdomssymptom (Folkhälsomyndigheten 2014).

Andelen enterokocker i en människas tarmflora begränsas normalt genom en naturlig konkurrens från andra bakterier, samt genom det låga pH-värdet från magsyran. Vid användning av antibiotika dödas en del av den naturliga bakteriefloran i magtarmkanalen, samt så förändras magsyreproduktionen. Detta skapar en gynnsam miljö för tillväxt av antibiotikaresistenta enterokocker, vilka kan sprida sig från magtarmkanalen ut i kroppen via blod- och lymfsystem och då orsaka sjukdom (Lebreton et al. 2014). På detta sätt ökar även risken för spridning mellan människor, då antibiotikabehandling hos en infekterad person bidrar till en förökning av antibiotikaresistenta bakterier som kan sprida sig vidare. Spridning av enterokocker mellan människor sker oralt-fekalt, med ökad risk för spridning då en infekterad person har diarré (Folkhälsomyndigheten 2014).

Enterokocker etableras lätt i sjukhusmiljöer då de kan leva länge på öppna ytor. De tål långa perioder av torka och är svåra att städa bort. Miljöodlingar av bakterier i rum där infekterade patienter har vistats visar att vankomycinresistenta bakterier finns på ytor patienten ofta tar på, så som spolknappen på toaletten, sängbordet och mobiltelefonen (Folkhälsomyndigheten 2014). Enterokockers möjlighet att överleva länge i miljöer är anledningen till den stora spridningsmöjligheten på sjukhus (García-Solache & Rice 2019).

3.4.2 Vankomycinresistens

Vankomycin verkar genom att binda till grampositiva bakteriers cellvägg. Där förhindras peptidkedjor på cellväggen från att korsbindas, vilket gör att bakterierna dör av defekta cellväggar. Hos vankomycinresistenta enterokocker förekommer en

mutation som förändrar strukturen i cellväggarna. Det gör att antibiotikan ej får fäste, och förlorar därmed effekten (Folkhälsomyndigheten 2014).

Ett flertal arter av enterokocker har vankomycinresistens (Hegstad et al. 2010; Folkhälsomyndigheten 2014). Det finns naturligt förekommande vankomycinresistens hos *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* och *E. flavences*, där är resistensen är lokaliserad till bakteriernas kromosomer och därför ej överförbar mellan bakterier (Hegstad et al. 2010). Gener för vankomycinresistens kan även vara lokaliserade till enterokockernas plasmider, vilket är förvärvat vankomycinresistens som kan föras vidare till andra bakterier (Hegstad et al. 2010; Folkhälsomyndigheten 2014).

En gentyp av vankomycinresistens som är typisk för enterokocker har påvisats hos ett annat bakteriesläkte, *Staphylococcus aureus* som även bär på resistens mot antibiotikumet Meticellin (Weigel et al. 2003; Kacica 2004). På grund av fynden finns en oro att generna som kodar för antibiotikaresistens kan spridas från enterokocker till andra bakterier med högre virulens (Willems et al. 2005). Bakterier med hög virulens framkallar allvarligare sjukdom.

3.4.3 Ammoniakhygienisering av enterokocker

Vid en undersökning av ureahygienisering av olika bakterier visade det sig att enterokocker är mer tåliga mot högt pH och ammoniakbehandling jämfört med *Salmonella* spp. och andra bakterier av släktet *Enterobacteriaceae*. En förklaring till detta är att enterokocker är grampositiva bakterier, vilket innebär att de har en mer komplex cellvägg som kan ge bättre skydd i jämförelse med gramnegativa bakterier som salmonella och *Enterobacteriaceae*. Oavsett temperatur (4-34°C) tog det tio gånger längre tid för 1 log₁₀ reduktion av enterokocker jämfört med salmonella i ureabehandlade fekalier (Nordin 2010).

Vid låga koncentrationer av ammoniak var avdödningen av enterokocker långsam då temperaturen låg under 26°C. Avdödningen hade bäst effekt vid en kombination av temperaturer över 14 °C och en koncentration av $\geq 100\text{mM}$ ammoniak (Nordin 2018).

Anledningen till den dåliga avdödningen vid låga temperaturer kan bero på sammansättningen av enterokocker som undersöktes i studien. Används enterokocker som är naturligt förekommande i ammoniakrika miljöer är det möjligt att de har anpassat sig efter omgivningen. Detta har bland annat setts vid en studie där gödsel rötades (Ottoson et al. 2008). Om enterokocker ska användas som indikatororganismer vid hygienisering av klosettatten kan det därför vara bra att isolera och studera enbart *E. faecalis*, då de har ett mer konsekvent inaktiveringsmönster vid avdödning med ammoniak (Nordin et al. 2018).

En modell för inaktiveringshastighet för *E. faecalis* beroende på koncentrationen av NH₃ och temperatur har föreslagits (Nordin 2018):

Ekvation 3
$$-k_{E. faecalis} = [\text{NH}_3] * 0,00055e^{(0,05T)}$$

3.4.4 Enterokocker som indikatororganismer

Enterococcus spp. har traditionellt använts som indikatororganismer då de tillhör gruppen med grampositiva bakterier. Grampositiva bakterier har cellväggar som skyddar bättre mot höga temperaturer, desinfektionsmedel och höga salthalter jämfört med bakterier som är gramnegativa. På grund av dessa egenskaper anses enterokocker kunna indikera en effektiv reduktion av tåliga patogener vid hygienisering bättre än till exempel *E. coli*, då *E. coli* är en gramnegativ bakterie.

Enterokockers värde som indikatororganismer har diskuterats då de förekommer både i fekala- och ickefekalt förorenade miljöer. Därmed bekräftar inte nödvändigtvis förekomsten av enterokocker att ett material innehåller fekala bakterier och patogener, då enterokockerna lika gärna kan ha annat ursprung.

Det har även antagits att det kan vara problematiskt att använda *Enterococcus* spp. som indikatororganismer vid ammoniakhygienisering då förekomst av andra än "fekala" enterokocker skulle kunna vara mindre känsliga mot koncentrationer av NH_3 då de koloniserar andra miljöer än mag-tarmkanalen (Nordin et al. 2013).

3.4.5 Odlingsmedium för enterokocker

Slanetzy-Barley agar (kallas härfter SlaBa) har länge använts för detektion och koncentrationsbestämning av enterokocker och anges som odlingsmedium vid vattenanalys enligt S-EN ISO 7899-2. SlaBa är selektivt för enterokocker men särskiljer ej mellan olika arter.

Ett odlingsmedium som används för att detektera vankomycinresistenta enterokocker är CHROMagar™ VRE (härfter kallat VRE), som dessutom särskiljer de kliniskt intressanta *E. faecium* och *E. faecalis* från andra enterokocker. VRE har även använts utan Vankomycin för detektion och koncentrationsbestämning av luftburna bakterier i avloppsreningsverk (Hsiao et al. 2014).

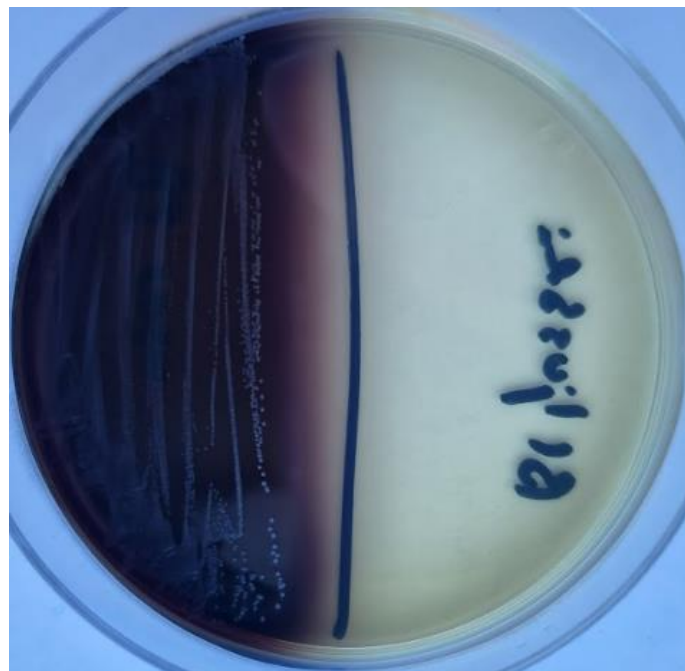
Vid odling av enterokocker på VRE kan L-Arabinose diatabs (härfter kallat arabinostest) användas för att differentiera *E. faecalis* från *E. faecium*, då *E. faecium* har förmåga att fermentera arabinos. Vid fermenteringen av arabinos bildas syra som biprodukt vilket sänker pH-värdet och ger lösningen en gul färg (VUMICRO 2022). *E. faecalis* kan inte fermentera arabinos och bibehåller den ursprungliga röda färgen på lösningen, därmed kan de två arterna skiljas från varandra (Rosco Diagnostica 2009). Arabinostest går även att använda för att särskilja andra enterokocker från varandra (Tabell 2).

Samtliga enterokocker har förmåga att hydrolysera esculin (Manero & Blanch 1999). Bile esculine azide agar (härfter kallad Esculinagar) innehåller även gallsalter, vilket gör mediet selektivt för enterokocker. Vid hydrolys av esculin

färgas agarn svart då nedbrytningsprodukter av esculin reagerar med järncitrat (Figur 1). Vid tester av presumtiva enterokocker på esculinagar indikerar en utebliven hydrolys att den testade kolonin förmodligen inte är *Enterococcus* spp.

Tabell 2. Arabinostest kan användas för att differentiera arter av enterokocker då de har olika förmåga att hydrolysera arabinos. Gul = hydrolys av arabinos, röd = ingen hydrolys av arabinos (Manero & Blanch, 1999)

Art	Färg på lösning vid arabinostest
<i>Enterococcus faecium</i>	gul
<i>Enterococcus faecalis</i>	röd
<i>Enterococcus durans</i>	röd
<i>Enterococcus hirae</i>	röd
<i>Enterococcus gallinarum</i>	gul
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	gul
<i>Enterococcus raffinosus</i>	gul
<i>Enterococcus avium</i>	gul
<i>Enterococcus mundtii</i>	gul



Figur 1. Esculinagar med tillväxt av enterokocker vilka ger svart fällning i vänstra delen av agarplattan. Ingen bakterietillväxt eller nedbrytning av esculin på högra halvan av agarplattan

4. Material och metod

4.1 Material och metod som användes i båda delarna av arbetet

4.1.1 Avlopps- och klosettavloppsvatten

Det blandade avloppsvattnet (härefter kallat avloppsvatten) som analyserades i detta arbete samlades in från Kungsängsverket som drivs av Uppsala Vatten och Avfall AB. År 2021 var 199 600 personekvivalenter anslutna till Kungsängsverket. Kungsängsverket har tillstånd att behandla vatten för högst 200 000 personekvivalenter (Uppsala vatten 2021). Proverna bestod av ingående vatten som samlades in innan reningsverkets sandfång. Proverna togs i triplikat, A, B och C, i 1L sterila plastflaskor år 2023 vid datumen 14/2, 28/2, 7/3, 14/3 samt 21/3. Efter provtagning transporterades proverna till laboratoriet, där analyser genomfördes omgående.

Allt klosettavloppsvatten (härefter kallat klosettwater) som användes i detta arbete togs från Solberga kretsloppsanläggning, Västerhaninge den 21/3 2023. Den batch klosettwater (650 m³) som material togs från var insamlad från enskilda avlopp (174 hushåll) och en gemensamhetsanläggning i en fritidsby under tiden maj 2021 till oktober 2022. Vid uttag för material hade klosettwater blandats om med en fast installerad omrörare i 12 timmar och 6 prov om en liter togs ut med en bägare fäst på en stång. Efter provtagning transporterades proverna till laboratoriet där analyser genomfördes omgående.

4.1.2 Odlingsmedium vid koncentrationsbestämning

CHROMagar VRE (tillverkare CHROMagarTM, agarn kallas härefter VRE) var det odlingsmedium som främst användes i båda delarna av denna studie för koncentrationsbestämning av enterokocker. *E. faecalis* och *E. faecium* växer med rosa kolonier, övriga enterokocker ger blå kolonier (CHROMagarTM u.å.). VRE tillreddes på plats i labbet i 90 mm ventilerade petriskålar, med och utan Vancomycin. Vancomycinlösning (CHROMagarTM VRE supplement) tillsattes med 6mg/L agar enligt tillverkarens instruktioner.

VRE med tillsatt Vankomycin kommer här efter benämnas som VRE+ och VRE utan tillsatt Vankomycin kommer här efter benämnas som VRE-.

För kontroll av nytillverkad agar samt funktionen hos biokemiska tester (Tabell 3) användes kända kontrollstammar (Tabell 3). Kontroll av agar gjordes med kontrollstammar vid varje ny omgång av agartillverkning för att säkerställa deras funktion. De kända bakteriestammarna odlades upp på nötblodagar (SVA).

Tabell 3. Kända stammar av bakterier som användes för kontroll av nytillverkad agar samt vid biokemiska tester

Kontrollstam	Kommentar
<i>Enterococcus faecium</i> NCTC 122042	Vankomycinresistent
<i>Enterococcus faecalis</i> 12697	Vankomycinkänslig
<i>Escherichia coli</i> NTCT 12241	Gramnegativ. Bör ej kunna växa på SlaBa eller VRE. Bör ej ha samma reaktion som enterokocker vid biokemiska tester.

4.1.3 Spädningsserier för koncentrationsbestämning av enterokocker

Koncentrationsbestämningen av enterokocker skedde enligt följande:

- 1) Spädningsserier med buffrad NaCl peptonlösning med tween pH 7.0 (1 ml avloppsvatten blandades med 9 ml) bereddes till önskade koncentrationer.
- 2) 0,1 ml av de önskade utspädningar spreds på VRE+ och VRE- som inkuberades i 37°C i 24 h. Om möjligt räknades bakteriekolonierna på plattor med 30 till 100 cfu. Vid odling på SlaBa (som gjordes undantagsvis i arbetet) var inkuberingstiden 48h.
- 3) Slumpmässigt utvalda kolonier av presumtiva enterokocker ströks på Esculinagar (VWR International) som inkuberades 24h i 37°C.

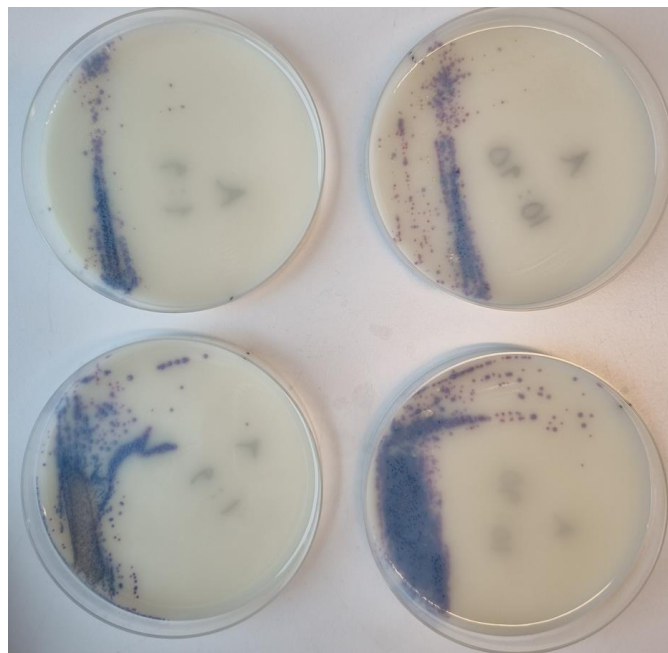
4.2 Del 1: Förekomst av enterokocker i blandat avloppsvatten samt klosettavloppsvatten

I den första delen av detta arbete undersöktes koncentrationer av enterokocker i avloppsvatten och klosettavatten där *E. faecalis* och *E. faecium* koncentrationsbestämde separat från övriga arter av *Enterococcus* spp. Även andelen enterokocker med vankomycinresistens undersöktes. Syftet med den första delen av arbetet var att samla grundläggande information om enterokocker i avloppsvatten och klosettavatten.

Avloppsvatten provtogs i triplikat vid 5 tillfällen och användes i spädningsserier för koncentrationsbestämning av enterokocker. Förekomsten av enterokocker i klosettavatten bestämdes med samma metod, för triplikata prover, men bara vid ett

tillfälle beroende på att det var det klosettvattnet som fanns att tillgå. Då avloppsvattnet samlades in från ett större antal hushåll bör koncentrationen av enterokocker i avloppsvattnet vara mer representativt för förekomsten i samhället jämfört med klosettvattnet som lagrats en längre tid. Spädningsgraderna som användes vid koncentrationsbestämning av enterokocker i klosettvattnet och avloppsvattnet var 10^{-1} , 10^{-2} och 10^{-3} . För koncentrationsbestämning av vankomycinresistenta enterokocker användes utspätt avlopps- och klosettvattnet.

För att sänka detektionsgränsen för vankomycinresistenta enterokocker som undantagsvis gav kolonier vid utstrykning av 0,1 ml utspätt avloppsvatten gjordes anrikningar (1:9) i hjärt- och hjärnbuljong (Brain heart infusion broth, VWR). Anrikning av 1 ml och 10 ml avloppsvatten gjordes i sterila plastpåsar. Lösningarna inkuberades i 37°C i 24 timmar då anrikningen ströks på plattor med VRE+. Plattorna inkuberades i 37°C i 24 timmar (Figur 2). Presumptiva Vankomycinresistenta enterokocker (slumpvis utvalda) konfirmerades på esculinagar.



Figur 2. Kolonibildning av anrikade enterokocker från avloppsvattenprov A på VRE-agar med Vankomycin. Plattorna till vänster är från anrikning av 1 ml och plattorna till höger är från anrikning 10 ml

4.2.1 Isolering av stammar

En blå och en rosa koloni med typiska utseenden på VRE- isolerades från avloppsvatten (provtaget 7/3) i del 1 för att användas i del 2 av detta arbete. Vid isoleringen ströks stammarna på nötblodagar (SVA). Biokemiska test gjordes på stammarna för att konfirmera att de var enterokocker (Tabell 4). Arabinostest

användes för att undersöka om den rosa stammen bestod av *E. faecalis* eller *E. faecium*.

Tabell 4. Biokemiska tester som användes för konfirmering- samt differentiering av enterokockstammar isolerade från avloppsvatten i del 1 av arbetet

Biokemiska tester	Tillverkare	Kommentar
Katalastest med väteperoxid 3%		Utebliven gasbildning indikerar förekomst av enterokocker
Gramfärgning	Merck KGaA	Lila/blå bakterier indikerar förekomst av enterokocker
Esculinagar	VWR International	Hydrolys av esculin ger svart fällning och indikerar förekomst av enterokocker
Arabinostest	Rosco Diagnostica	Hydrolys av arabinos ger gul lösning (indikerar <i>E. faecium</i>). Utebliven hydrolys behåller röd lösning (indikerar <i>E. faecalis</i>).

4.2.2 Metodutveckling

Vid studiens start testades strykning av Vankomycin på färdiggjutna SlaBa-plattor för att användas parallellt med VRE+ som odlingsmedium. SlaBa-agar köptes som färdiga 90 mm agarplattor från SVA. För att tillsätta Vancomycin till SlaBa-agar pipetterades Vancomycinlösning (CHROMagar™ VRE supplement) motsvarande 6mg/L agar på SlaBa-agar, ströks ut med en spatel på agarns yta och tilläts diffundera till nästa dag. Tillväxt av *E. faecalis* 12697 (Vankomycinkänslig) på SlaBa-agar med Vankomycin indikerade att metoden inte fungerade som avsett, därför användes inte SlaBa med tillsatt Vankomycin i studien.

I metodutvecklingssyfte jämfördes även selektiviteten för detektion av enterokocker hos SlaBa och VRE. Avloppsvatten provtaget datumen 14/2 och 28/2 odlades på SlaBa utan tillsatt Vankomycin parallellt med VRE-. Syftet för odlingen var att kunna jämföra antalet kolonier på SlaBa med kolonitillväxten på VRE- vid odling av samma prov avloppsvatten.

4.3 Del 2: Olika enterokockers inaktiveringshastighet vid ureabehandling

I den andra delen av arbetet studerades olika arter och stammar av enterokocker med avseende på deras inaktiveringshastighet vid ureabehandling (1% urea vid 14°C). Syftet var att se om det fanns någon skillnad i känslighet mellan de olika enterokockerna, vilket skulle kunna påverka värdet av *Enterococcus* spp. som indikatororganismer.

Fem olika stammar av enterokocker studerades (2 isolerade från klosettvattnen i del 1 av studien, och 3 tidigare kända stammar). För att kunna studera de tillsatta stammarna separat och undvika störningar från oönskade bakterier odlades stammarna upp och tillsattes i autoklaverat klosettvattnen i separata kärl. Parallellt med enterokockstammarna som tillsattes i autoklaverat klosettvattnen undersöktes inaktiveringen av de naturligt förekommande enterokockerna i klosettvattnen och avloppsvatten (Tabell 5).

Försöket varade 40 dagar, från kl. 15:30 den 23/3 till och med kl. 9:15 den 2/5. Temperaturen loggades med Tinytags (Intab, Sverige). Inaktiveringshastigheten hos de olika enterokockstammarna fastställdes genom att följa koncentrationerna över tid (Tabell 6).

Vid koncentrationsbestämningen av de olika stammarna skakades först provlösningarna för att få ett homogent innehåll. 4 ml lösning pipetterades och fördes över till eppendorfrör med lock, kvarvarande provlösning ställdes tillbaka i kylen för att förhindra att den skulle bli rumstempererad. Av de 4 ml som pipetterades gjordes koncentrationsbestämningen av enterokocker via spädningar enligt instruktionerna i avsnitt 4.1.3. Mätningar av kemiska parametrar gjordes på lösningen i eppendorfrören som blev kvar efter att spädningar gjorts för koncentrationsbestämning.

För kontroll av kemiska parametrar i provlösningarna mättes koncentrationen av ammoniak, pH och elektrisk konduktivitet. Dag 33 analyserades även Ammoniak NH-N och Urea NH-N i mg/l i spektrofotometer Gallery™ Aqua Master Discrete Analyzer (Tabell 6).

Tabell 5. Material och tillsatta stammar av enterokocker vid ureahygieniseringen

Material	Enterokocker	Provlösningsskod	Färg på VRE	Vankomycin-resistens
Avloppsvatten	Naturligt förekommande	D	Blå och rosa	-
Klosettvattnen	Naturligt förekommande	E	Rosa	-
	<i>E. faecalis</i> isolerad från avloppsvatten	F	Rosa	-
Autoklaverat klosettvattnen	<i>Enterococcus</i> sp.*	G	Blå	-
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	H	Rosa	-
	<i>E. faecium</i> NCTC 122042	I	Rosa	Ja
	<i>E. faecalis</i> 12697	J	Rosa	-

Tabell 6. Tidpunkter i försöket för koncentrationsbestämning av enterokocker, samt mätning av kemiska parametrar

Dag	Mätning av kemiska parametrar
-----	-------------------------------

0, innan tillsatser av stammar, urea och ureas	EC, pH, ammoniak
0, efter tillsatser av stammar, urea och ureas	EC, pH, ammoniak
6	-
12	-
19	EC
26	EC
33	EC, pH, Ammoniak NH-N, Urea NH-N
40	EC, pH

4.3.1 Flödesschema vid tillverkning av provlösningar

- 1) Autoklivering av 2L klosettatten i glasflaskor om 1L i 121°C i 60 minuter. Flaskorna fick därefter stå i rumstemperatur med stängd kork för att svalna över natten.
- 2) 350g autokliverat klosettatten, obehandlat klosettatten eller obehandlat avloppsvatten mättes upp i 7 sterila plastburkar om 500ml.
- 3) Anrikning av enterokockstammar
 - i) Odling av respektive stam på nötblodagar (90mm petriskål färdigtillredd av SVA), inkubering 24h 37°C.
 - ii) Överföring av en koloni per stam till ett varsitt i eppendorfrör med lock med 5ml autokliverad näringsbuljong (Nutrient broth CM0001, Oxoid, tillredd enligt tillverkarens anvisningar). Kolonierna i näringsbuljong inkuberades under 2 h i 37°C.
 - iii) Kolonierna i näringsbuljong späddes ut med ytterligare 50ml näringsbuljong och inkuberades sedan ytterligare 24 h i 37°C.
 - iv) Efter inkubering centrifugerades lösningen (Heraeus labofuge 400 R centrifuge, 4500rpm, 10 minuter i 20°C) så bakterierna samlades i botten på provrören och näringslösningen kunde hällas av.
 - v) 0,5ml NaCl 0,9% tillsattes till de ansamlade bakterierna och lösningen vortexades för att fördela bakterierna i saltlösningen.
- 4) Anrikade stammar av enterokocker tillsattes i provlösning F till J ca kl. 11:30.
- 5) Ureaslösning tillreddes med 20mg ureas (300microgram per mg) i 8 ml milliQ-vatten.
- 6) Ca. kl.13:30 tillsattes i samtliga provlösningar 1% additivt (3,5g) urea (tillverkare Supelco) per burk samt 0,5ml ureaslösning.
- 7) Provlösningarna blandades och fördelades därefter i sterila burkar i triplikat, 100g lösning per burk.

Urea bryts ned via ureas, ett extracellulärt enzym vilket normalt bildas av bakterier i klosettatten. Då enterokocker inte bildar ureas, och då autoklivering av

klosettvattnet antogs inaktivera både ureasbildande bakterier och fritt förekommande ureas-enzym tillsattes ureas till alla ureabehandlingar.

4.3.2 Beräkning av kemiska parametrar

Dag 33 analyserades provlösningarnas innehåll av NH-N. Fraktionen NH₃ (f_{NH_3}) multiplicerades med koncentrationen av uppmätt ammoniak NH-N för att räkna ut andelen NH₃ i lösningarna. f_{NH_3} beräknades enligt följande ekvation ($pK_a = 9,753$ enligt Ekvation 1):

$$\text{Ekvation 2} \quad f_{\text{NH}_3} = \frac{1}{(10^{pK_a - \text{pH}}) + 1}$$

Andelen nedbruten urea beräknades enligt följande ekvationer:

$$\text{Ekvation 4} \quad \text{N urea g/l} = \frac{[\text{tillsatt urea NH-N}]}{60,06} * 14,01 * 2$$

$$\text{Ekvation 5} \quad f_{\text{Nedbruten urea}} = \frac{[\text{Ammoniak N g/l}]}{[\text{urea N g/l}]}$$

4.4 Statistiska analyser

Samtliga statistiska analyser utfördes i Minitab.

Då potentiellt statistiska skillnader mellan två olika grupper undersöktes användes ett tvåsidigt t-test med 95% signifikansnivå. Undersöktes signifikanta skillnader mellan fler än två grupper användes ANOVA envägstest med Tukeys metod för parvisa jämförelser, även där med signifikansnivå 95%.

För modellering av regressionslinjer över mätdata från försöket med ureahygienisering användes icke-linjär regression med följande ekvation:

$$\text{Ekvation 6} \quad N_t = N_0 (1 - (1 - 10^{k*t})^{10^n})$$

Ekvationen kan beskriva ett hygieniseringsmönster som innefattar eventuell lagfas, det vill säga en fas utan inaktivering av mikrober, som sedan följs av log-linjär avdödning. Lagfasen är en funktion av n och k (n/-k) där k = konstanten för inaktiveringshastigheten och t = dagar. Algoritmen som användes för regressionsanpassningen var Gauss-Newton, se tabell 7 för använda startparametrar och startvärden för regressionen.

Tabell 7. Startparametrar och värden för metod som användes i regressionsberäkning av inaktiveringsmönstret

Startparametrar och metod	Värden
Iterationer	200

Tolerans	0,00001
K, startvärde	-0,5
N, startvärde och begränsning	0,5 samt >0

5. Resultat

5.1 Metodutveckling

5.1.1 SlaBa-agar med tillsatt Vankomycin

Tillväxt av *E. faecalis* 12697, vilken inte har vankomycinresistens, på SlaBa-agar med Vankomycin indikerade att metoden att tillsätta Vancomycin genom att stryka ut lösning på färdiggjutna agarplattor inte fungerade som avsett. SlaBa valdes därför bort som medium i det fortsatta arbetet. SlaBa utan tillsatt Vankomycin användes vid två mätningar för att kunna jämföra tillväxten med den på VRE-agar utan tillsatt Vankomycin.

VRE-agar med Vankomycin inhiberade tillväxt av den icke-Vancomycinresistenta stammen och hade tillväxt av den resistenta stammen av enterokocker vilket bekräftade mediets funktion.

5.1.2 Jämförelse av enterokockkoncentration på SlaBa och VRE-

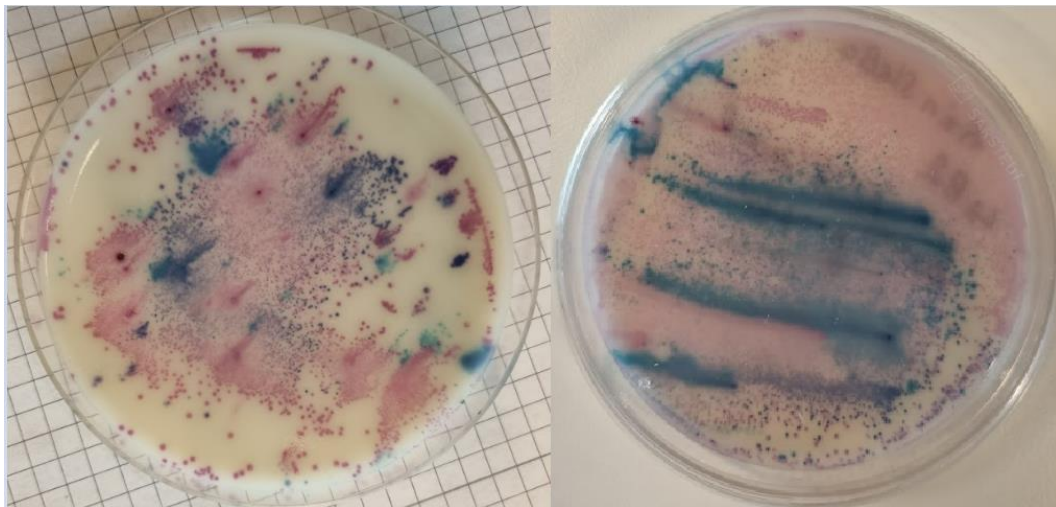
Enterokocker förekom i snitt med 29 513 cfu per ml avloppsvatten vid odling på SlaBa utan tillsatt Vankomycin (Tabell 8). Odling av avloppsvatten på SlaBa gav ca 35% lägre tillväxt av kolonier jämfört med odling av samma prov på VRE-agar utan Vankomycin (se bilaga 1 för rådata).

Tabell 8. Enterokocker i \log_{10} cfu per ml avloppsvatten vid odling på SlaBa. Avloppsvatten från prov A, B och C odlades i triplikat

		1	2	3
14 februari	A	4,05	4,52	-
	B	4,14	4,53	-
	C	4,12	4,46	-
28 februari	A	4,32	4,71	4,48
	B	4,35	4,58	4,00
	C	4,33	4,65	4,85

5.1.3 Överföring av kolonier med filter

Då metoden där Vankomycin tillfördes genom att yt-strykas på SlaBa var bristfällig testades överföring av kolonier från SlaBa till VRE- via filter. Plattan med SlaBa hade väl separerade kolonier. Syftet med filtermetoden var att få optimal selektion av enterokocker (från SlaBa) och kunna differentiera *E. faecalis* och *E. faecium* från andra enterokocker (på VRE-). Detta prövades vid två separata tillfällen med SlaBa plattor med väl separerade kolonier, men medförde en oväntat stor tillväxt av bakteriekolonier på VRE-agar. Metoden användes därför inte i detta arbete (Figur 3).



Figur 3. Tillväxt av kolonier på VRE-agar från SlaBa agar (båda agarna utan Vancomycin). *E. faecalis* och *E. faecium* förväntas ge rosa till lila kolonier och andra arter av enterokocker blåa kolonier. Ingen konfirmation av enterokocker utfördes för dessa plattor

5.1.4 Typer av kolonier på VRE-agar

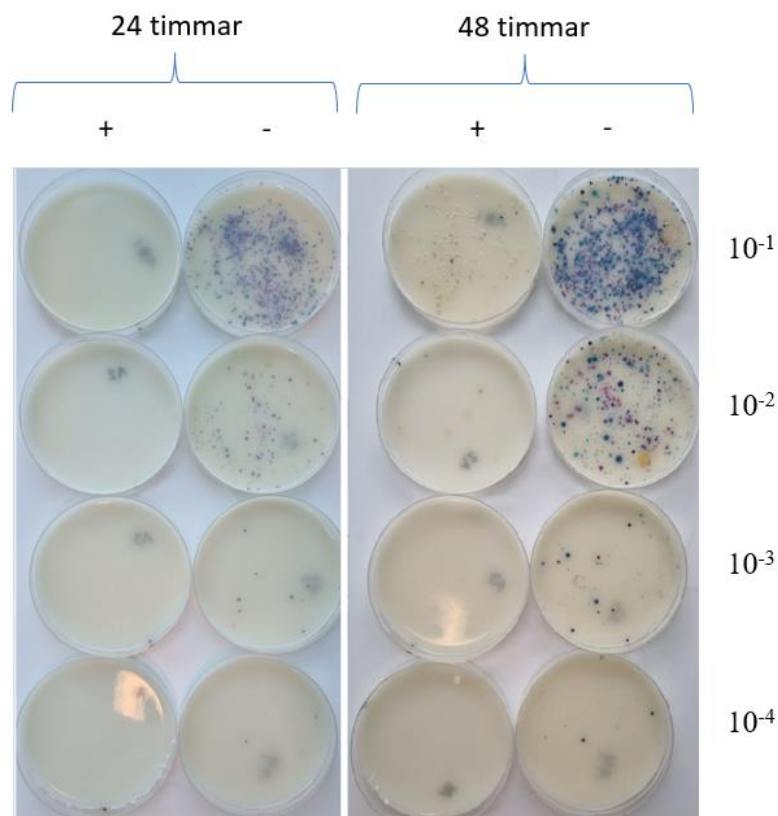
CHROMagarVRE är huvudsakligen avsett för att testa kliniska isolat av enterokocker för Vancomycin-resistens. *E. faecalis* och *E. faecium* ska enligt tillverkarens metod (CHROMagar™ u.å.) ge rosa-lila kolonier medan andra arter av enterokocker ger blå kolonier. Då avloppsvatten odlades på VRE- och VRE+ enligt tillverkarens instruktion (37C, 24 h) observerades kolonier av varierande färg. Stora kolonier som växte i gult, grönt och grå/brunt utslöts vara enterokocker, vilket även bekräftades då de ej hydrolyserade esculin. De blå kolonierna antogs först inkludera alla nyanser, även de ljusare som hade en turkos nyans. Vidare strykning av kolonier på Esculinagar visade att endast 1 av 21 turkosa kolonier, <5%, hydrolyserade esculin, och de räknades därför ej fortsättningsvis som enterokocker. Kolonier i många olika nyanser av rosa och lila observerades. Då kolonierna var rosa, lila och blå på VRE så hydrolyserade de esculin.

5.1.5 Minskad selektivitet med 48 timmars inkubering av VRE-agar

Vid odling av avloppsvatten på VRE-agar med tillsatt Vankomycin skedde ingen tillväxt efter 24 timmars inkubering med detektionsgräns 100 cfu/ml. Vid förlängd inkubering till 48 timmar med både VRE- och VRE+, för att se om känsligheten kunde ökas visade att 48 timmars inkuberingstid gav fler falskpositiva kolonier (60%) jämfört med 24 timmar (30%) (Tabell 9). Kolonierna ansågs vara falskpositiva då de inte kunde hydrolysera esculin trots ett typiskt utseende på VRE-agar.

Inkubering av VRE utan Vankomycin i 48 timmar gav fler och större kolonier jämfört med inkubering vid 24 timmar. Även färgen på kolonierna förändrades, och hade efter 48 timmars inkubationstid djupnat (Figur 4). De rosa kolonierna blev mörkrosa, och de grå/blå kolonierna blev mörkblå. Antalet kolonier blev i vissa fall lägre efter 48 timmar jämfört med efter 24 timmar vilket såg ut att bero på att små kolonier som tidigare legat enskilt hade blivit överväxta av andra kolonier.

Den minskade selektiviteten samt osäkerheten i att gå ifrån tillverkarens metod, vilken rekommenderar inkubering i 24 timmar (CHROMagar™ u.å.), ledde till att endast inkubering i 24 timmar fortsättningsvis användes i arbetet.



Figur 4. Foto av avloppsvatten på VRE-agar med Vankomycin (+) och VRE-agar utan Vankomycin (-) efter inkubering 24 h (till vänster) och 48 h (till höger) i 37°C. Plattorna högst upp i bild är spädda 10^{-1} , följt av spädningsarna 10^{-2} , 10^{-3} och 10^{-4} i fallande ordning

Tabell 9. Esculinhydrolyt för kolonier som inkuberats i 24 och 48 timmar på VRE+

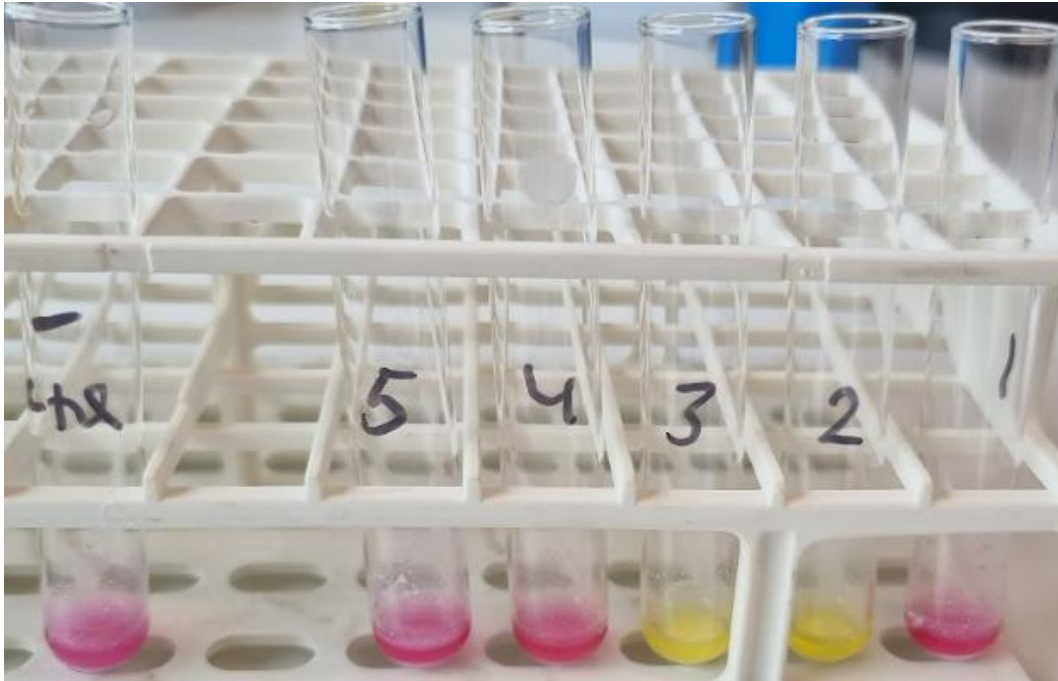
	Esculinhydrolyt VRE+ 24 timmar	Esculinhydrolyt VRE+ 48 timmar
Blå	13/13 (100%)	9/11 (82%)
Lila	6/7 (86%)	1/6 (17%)
Mörklila	-	0/3 (0%)
Ljuslila	1/4 (25%)	4/4 (100%)
Rosa	11/19 (58%)	2/14 (14%)
Ljusrosa	4/7 (57%)	0/2 (0%)
Tot. kolonier med esculinhydrolyt	35/50 (70%)	16/40 (40%)

5.2 Isolering av stammar från avloppsvatten

En blå och en rosa koloni med typiska utseenden isolerades från avloppsvatten (provtaget 7/3) som hade odlats på VRE-agar utan Vankomycin.

Båda de isolerade stammarna hydrolyserade esculin, gav negativt svar vid katalastest samt färgades blå/lila vid gramfärgning, allt i enighet med hur enterokocker bör bete sig (Tabell 4). Därför antogs stammarna vara enterokocker. Ingen av isolaten visade på Vankomycinresistens.

L-arabinostest (Figur 5) färgade de kända stammarna, nr 1, 2 och 4 i respektive färg i enlighet med metoden. Stammen av rosa enterokocker som isolerades från avloppsvatten behöll sin röda färg i arabinostestet, vilket indikerar att stammen tillhör arten *E. faecalis*.



Figur 5. Stammarna av enterokocker som isolerades ur avloppsvattnet i del 1 av arbetet, samt de kända stammarna av enterokocker som användes i del 2 av arbetet kontrollerades med L-arabinostest (Rosco Diagnostica). Färgomslag från rött till gult visar på förmåga att hydrolysera arabinos. Nr1: *E. faecalis* 12697. Nr2: *E. faecium* NCTC 122042. Nr3: blå enterokock från VRE-. Nr4: *E. faecalis* ATCC 29212. Nr5: rosa enterokock från VRE-. Längst till vänster i bild är en negativ kontroll som enbart innehöll fysiologisk saltlösning

5.3 Enterokocker i avloppsvatten

I genomsnitt förekom Enterokocker med 45 838 cfu per ml avloppsvatten vid odling på VRE-agar (Figur 6). Av kolonierna visade sig 77% bestå av *E. faecalis* och *E. faecium*, och 23% bestå av övriga Enterokocker. Enbart 0,24% av samtliga enterokocker bar på Vankomycinresistens (Tabell 10). Fullständiga rådata ligger som Bilaga 1.

Tabell 10. Fördelning av enterokocker med och utan vankomycinresistens i avloppsvatten givet som koncentration (\log_{10} cfu/ml) och som procent av totala koncentrationen enterokocker. Då koncentrationerna inte var signifikant skilda mellan provtagningstillfällena ges medelvärde för alla provtagningarna

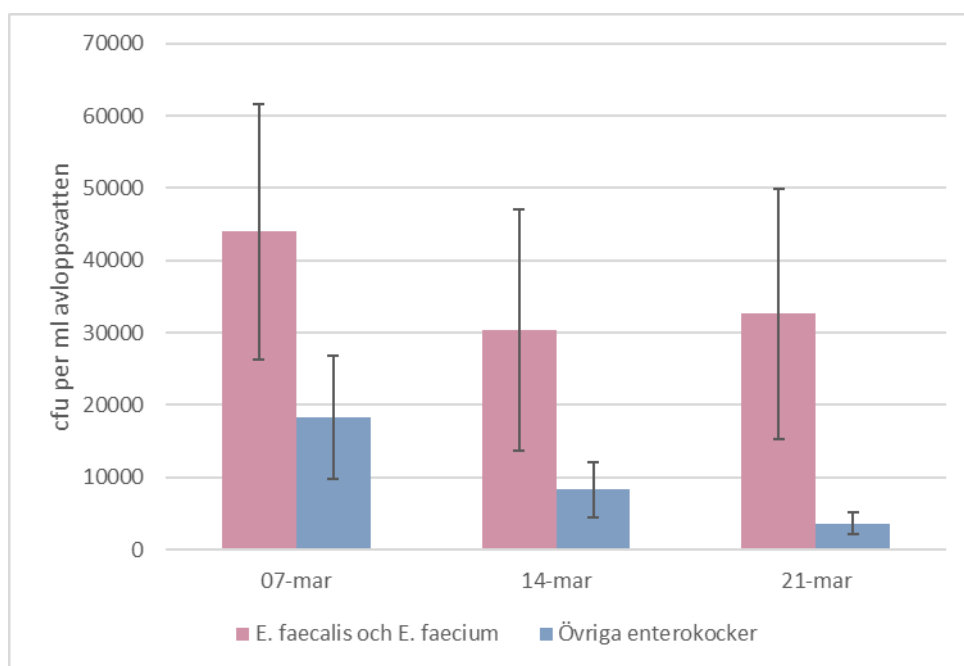
		7/3	14 /3	21/3	Medel	SD
<i>E. faecium</i> och <i>E. faecalis</i>	cfu/ml	4,64	4,48	4,51	4,55	0,07
Vankomycinkänsliga	andel	70%	78%	90%	77%	7,96%
Övriga enterokocker	cfu/ml	4,26	3,92	3,55	4,00	0,29
Vankomycinkänsliga	andel	29%	21%	10%	23%	8,01%
<i>E. faecium</i> och <i>E. faecalis</i>	cfu/ml	1,23	1,86	1,57	1,49	0,26
Vankomycinresistenta	andel	0,03%	0,19%	0,10%	0,10%	0,07%

Övriga enterokocker	cfu/ml	0,48	1,98	1,54	1,64	0,63
Vankomycinresistenta	andel	0,01%	0,24%	0,10%	0,14%	0,09%

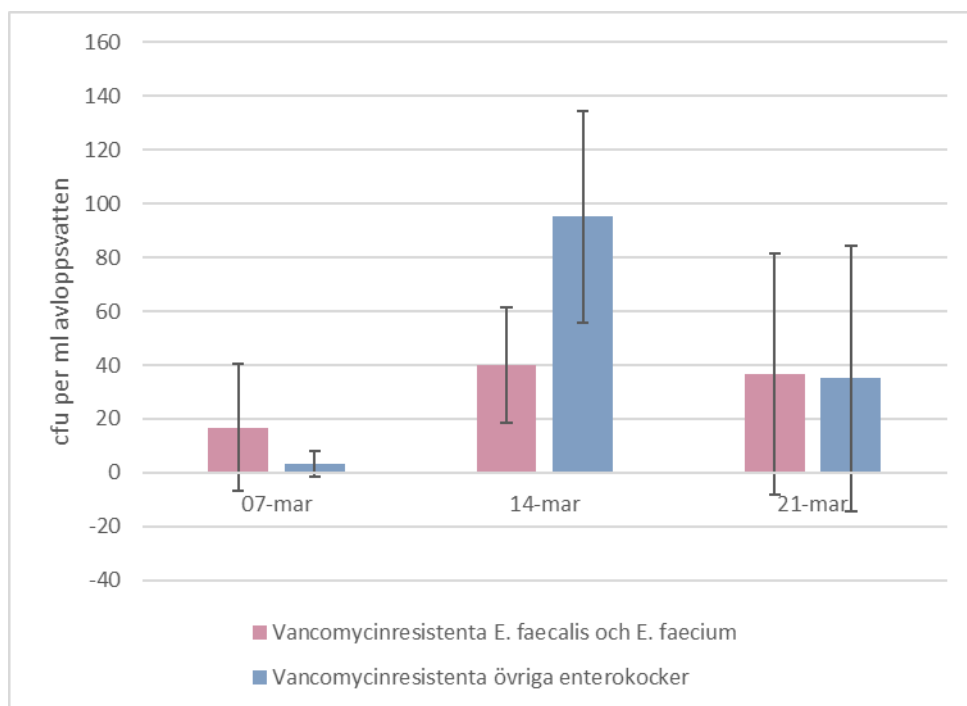
En jämförelse av koncentrationerna vid de olika provtagningsdatumen med ANOVA envägstest visade ej på någon signifikant skillnad i koncentration inom respektive provgrupp (Tabell 11).

Tabell 11. Jämförelse av koncentrationen av enterokocker mellan provdatumen i ANOVA envägstest visade ingen signifikant skillnad. $p > 0,05$ = ingen signifikant skillnad

	p-värde
<i>E. faecium</i> och <i>E. faecalis</i> Vankomycinkänsliga	0,715
Övriga enterokocker Vankomycinkänsliga	0,085
<i>E. faecium</i> och <i>E. faecalis</i> Vankomycinresistenta	0,742
Övriga enterokocker Vankomycinresistenta	0,111



Figur 6. Vankomycinkänsliga Enterokocker i avloppsvatten. Felstaplar visar standardavvikelsen för medelvärdet



Figur 7. Vankomycinresistenta Enterokocker i avloppsvatten. Felstaplar visar standardavvikelsen för medelvärdet

Då vankomycinresistenta enterokocker inte detekterades med direktstrykning av spädningsserier (detektionsnivå 10 cfu/ml) av alla prover den 7 och 21 mars (Bilaga 1) anrikades proverna av avloppsvatten i Hjärt- och hjärn-buljong. Vancomycinresistenta enterokocker påvisades i samtliga avloppsvattenprov redan vid anrikning av 1 ml avloppsvatten (detektionsgräns 1 cfu/ml) (Figur 7).

5.4 Enterokocker i klosettavloppsvatten

Vid odling på VRE-agar förekom *Enterococcus* spp. i genomsnitt med 9828 cfu per ml klosettavloppsvatten. 99,3% av enterokockerna utgjordes av *E. faecalis* och *E. faecium*, resterande 0,7% var andra enterokocker (Tabell 12).

Varken direktstrykning av outspätt klosettavloppsvatten eller anrikning av 1 samt 10 ml klosettavloppsvatten gav tillväxt av antibiotikaresistenta enterokocker vid odling på VRE+.

Tabell 12. Medelvärdet av enterokockkoncentrationen i klosettavloppsvatten

		21/3
<i>E. faecalis</i> och <i>E. faecium</i>	Log ₁₀ cfu/ml	3,99
	andel	99,3%
Övriga enterokocker	Log ₁₀ cfu/ml	1,33

	andel	0,7%
--	-------	------

5.5 Ureahygienisering

5.5.1 Ammoniak, pH och elektrisk konduktivitet

Vid försökets uppstart mättes pH, EC och ammoniak innan och efter tillsatser av urea, ureas och bakteriekulturer (Tabell 13). Det autoklaverade klosettvattnet hade högre pH-värde och en mindre andel NH-N jämfört med det naturliga klosettvattnet.

Tabell 13. Mätningar från dag 0. mM av NH-N efter tillsatt urea är teoretiskt beräknad. pH och EC för autoklaverat avloppsvatten efter tillsatt urea är medelvärden från provlösning F-J, se bilaga 3 för rådata

		Innan tillsatser			Efter tillsats av 1% urea och bakteriekulturer		
		pH	EC	mM NH-N	pH	EC	mM NH-N
Avloppsvatten	m	7,76	1,279	2,7	9,16	9,16	336
	SD	-	-	-	0	0	-
Klosettwater	m	7,92	5,344	46,1	8,68	6,54	380
	SD	-	-	-	0	0	-
Autoklaverat klosettwater	m	9,63	2,644	27,4	9,44	3,96	361
	SD	-	-	-	0,026	0,13	-

Dag 33 i försöket mättes, utöver pH och EC, även ammoniak NH-N (Tabell 14). Utifrån mätningarna av NH-N kunde andelen nedbruten urea- samt andelen NH₃ beräknas (tabell 15). Koncentrationen av ammoniak NH-N vid försökets slut visade sig vara signifikant högre i de material som inte autoklaverades (Tabell 16). Som grupp var även de kända isolaten signifikant skilda från de nya isolaten gällande koncentrationen av ammoniak NH-N (Tabell 16).

Tabell 14. Mätningar från dag 33

Material	Enterokocker		pH	EC	Uppmätt ammoniak NH-N (mg/l)
Avloppsvatten	Naturligt förekommande	m	9,55	17,870	4551
		SD	0,03	0,01	26
Klosettwater	Naturligt förekommande	m	9,25	21,590	4980
		SD	0,04	0,04	56
		m	9,33	8,962	1888

Autoklaverat klosett vatten	<i>E. faecalis</i> isolerad från avloppsvatten	SD	0,06	0,10	70
	<i>Enterococcus</i> sp.*	m	9,35	9,086	1959
		SD	0,06	0,03	13
	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	m	9,33	9,877	2168
		SD	0,04	0,43	117
	<i>E. faecium</i> NCTC 122042	m	9,29	9,925	2214
		SD	0,02	0,08	69
	<i>E. faecalis</i> 12697	m	9,35	10,413	2249
		SD	0,13	0,13	5

*Annan enterokock än *E. faecalis* eller *E. faecium*

Tabell 15. Beräknade värden baserade på medelvärdena av mätningarna dag 33 (tabell 14).

Material	Enterokocker		fNH ₃	mM NH ₃	Nedbruten urea
Avloppsvatten	Naturligt förekommande	m	48%	155	61%
		SD		0,87	4,25%
Klosett vatten	Naturligt förekommande	m	31%	111	57%
		SD		1,25	1,81%
	<i>E. faecalis</i> isolerad från avloppsvatten	m	35%	48	23%
		SD		1,87	0,68%
	<i>Enterococcus</i> sp.*	m	36%	51	24%
		SD		0,43	0,72%
Autoklaverat klosett vatten	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	m	35%	55	26%
		SD		2,95	1,43%
	<i>E. faecium</i> NCTC 122042	m	33%	53	25%
		SD		1,65	1,16%
	<i>E. faecalis</i> 12697	m	36%	58	24%
		SD		0,15	0,47%

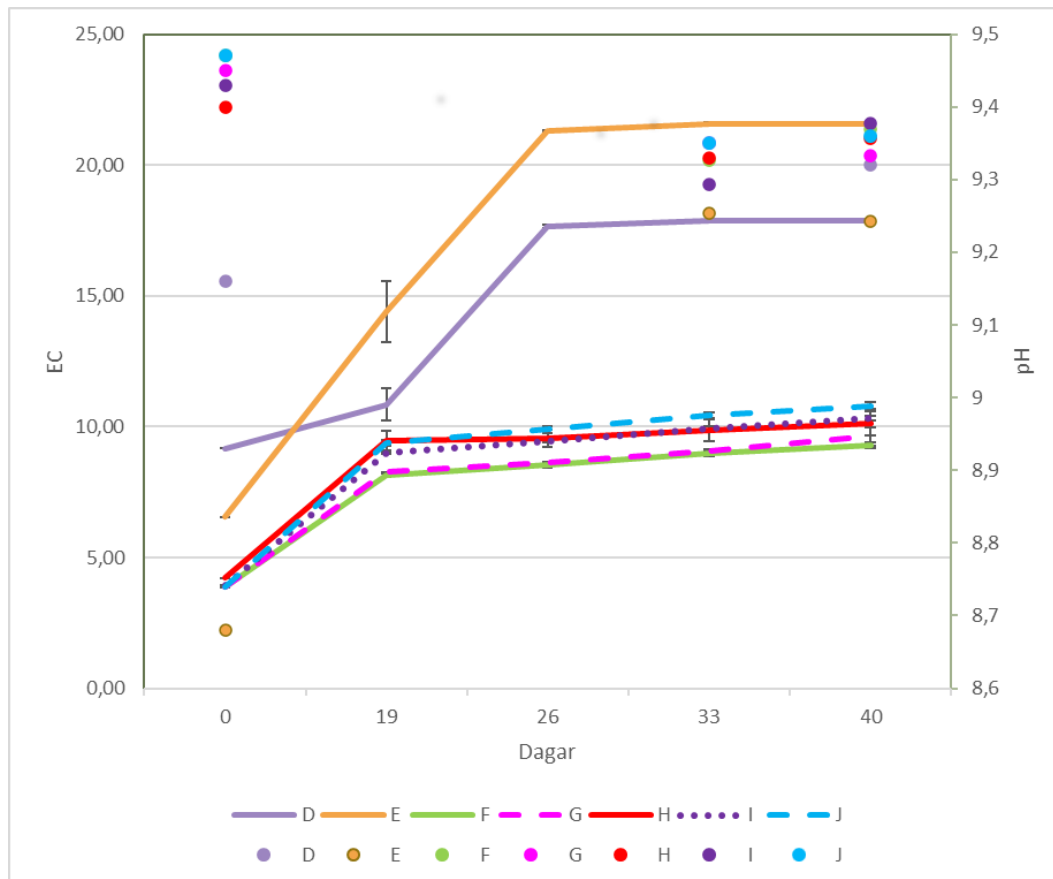
*Annan enterokock än *E. faecalis* eller *E. faecium*

Tabell 16. Signifikansgrupper från ANOVA envägstest med avseende på ammoniak N g/l. Signifikant skillnad föreligger mellan provlösningarna då stammarna tillhör olika grupper.

Klosett vatten	A		
Avloppsvatten		B	
<i>E. faecalis</i> 12697			C
<i>E. faecium</i> NCTC 122042			C
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212			C D
Oidentifierad blå från avloppsvatten			D E
<i>E. faecalis</i> isolerad från avloppsvatten			E

Mätningar av elektrisk konduktivitet över försökstiden visade att det naturliga avloppsvattnet (D) och klosettvatten (E) hade högre värden jämfört med övriga

provlösningar (Figur 8). Det naturliga avlopps- och klosettvattnet skilde sig statistiskt från de övriga lösningarna vid en jämförelse av EC-värden i ett ANOVA envägstest.



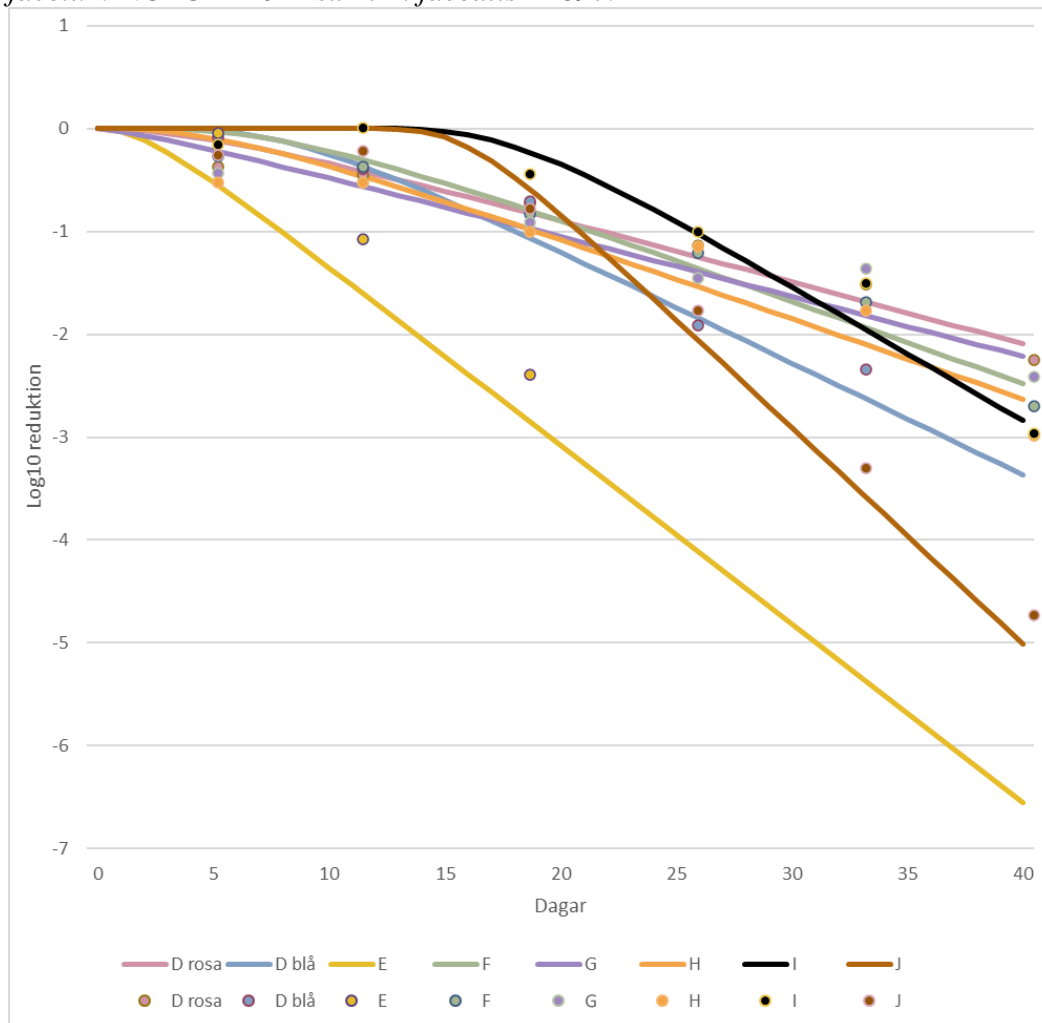
Figur 8. Linjerna visar elektrisk konduktivitet som bör korrelera med andelen nedbruten urea, prickarna visar pH-värden. Notera att skalan för elektrisk konduktivitet ligger till vänster och skalan för pH till höger i diagrammet. Felstaplarna visar standardavvikelsen av medelvärdet

5.5.2 Inaktivering av enterokocker

I början på försöket skedde ingen eller en mycket liten inaktivering av enterokockerna i respektive lösning, därför valdes en modell med lagfas för att beskriva inaktiveringsmönstret (Figur 9). Startkoncentrationerna av enterokocker skilde mellan de olika lösningar, där de naturligt förekommande enterokockerna var lägre i antal jämfört med stammarna som tillsattes i det autoklaverade klosettvattnet. Därför visas i figur 9 reduktionen från startvärdet.

E. faecalis 12697 hade längst lagfas, enterokockerna i det naturliga klosettvattnet samt den blåväxande oidentifierade enterokocken hade kortast lagfas. Efter lagfasen hade *E. faecalis* 12697 snabbast inaktiveringshastighet, *E. faecalis* och *E. faecium* i det naturliga avloppsvattnet hade långsammast inaktiveringshastighet (Tabell 18). Vid ett ANOVA envägstest där samtliga

behandlingar jämfördes visades att inaktiveringsmönstret för det naturliga klosettvattnet skiljde sig signifikant från *E. faecalis* isolerad från avloppsvatten, *E. faecium* NCTC 122042 samt *E. faecalis* 12697.



Figur 9. Reduktionen av enterokocker som en \log_{10} förändring från startvärdet. Punkterna i diagrammet motsvarar medelvärden av mätningar vid de olika tidpunkterna i försöket. Regressionsmodellerna baseras på Ekvation 6 med parametrar enligt tabell 18

Vid ett ANOVA envägstest, där koncentrationerna av enterokocker i de olika lösningarna under hela försökstiden undersöktes, förekom två grupper som skiljde sig signifikant från varandra. Oidentifierad blå enterokock isolerad från avloppsvatten (G), *E. faecium* NCTC 122042 (I) och *E. faecalis* 12697 (J) hade en signifikant högre koncentration av enterokocker jämfört med enterokockerna i det naturliga klosettvattnet (E) och samtliga enterokocker i det naturliga avloppsvattnet (D).

Detektionsgränsen nåddes under försökets gång för enterokockerna i det naturliga klosettvattnet och i det naturliga avloppsvattnet, den totala reduktionen som kunde påvisas var -2,34 respektive -2,39 \log_{10} (Tabell 18). Vid ett ANOVA

envägstest av den totala reduktionen uppnådde *E. faecalis* 12697 (J) en signifikant högre reduktion under försökstiden jämfört med de andra enterokockerna.

Tabell 17. Koncentrationerna av enterokocker i provlösningarna vid försökets uppstart samt avslut. Den totala reduktionen anges i logaritmerat värde

	Log ₁₀ cfu/ml dag 0	Log ₁₀ cfu/ml dag 40	Tot log ₁₀ red	SD tot log ₁₀ red
<i>E. faecalis</i> och <i>E. faecium</i> i naturligt avloppsvatten	4,23	1,99	-2,24	0,18
Övriga enterokocker i naturligt avloppsvatten	3,34	<1	<-2,34	>0,00
Enterokocker i naturligt klosettwater	3,93	<1	<-2,93	>0,00
<i>E. faecalis</i> isolerad från avloppsvatten	7,00	4,29	-2,70	0,11
Oidentifierad blå från avloppsvatten	7,21	4,80	-2,41	0,35
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	7,02	4,04	-2,98	0,33
<i>E. faecium</i> NCTC 122042	6,95	3,99	-2,97	0,33
<i>E. faecalis</i> 12697	7,03	2,30	-4,73	0,70

I försöket förekom tre bekräftade stammar av *E. faecalis*. *E. faecalis* isolerad från avloppsvatten och *E. faecalis* ATCC 29212 var lika både i avseende på lagfas och inaktiveringshastighet. *E. faecalis* 12697 särskilde sig genom att ha nästan dubbelt så lång lagfas jämfört med de andra *E. faecalis*, och därefter mer än dubbelt så hög inaktiveringshastighet (Tabell 18).

Tabell 18. Inaktiveringsparametrar för de olika enterokockerna (naturligt förekommande i avlopp (D) och klosettwater (E), och enskilda stammar tillsatta till autoklaverat klosettwater (F-J)) där k är inaktiveringshastighetskonstanten och n lagtid innan inaktiveringen påbörjas som en funktion av konstanten n och k (n/k). Inaktiveringsparametrarna (Tabell 6) från regressionsanalys med data för alla triplikaten varians för n och k anges som standard felet (SE). SSE (residualkvadratsumman) baseras på hela funktionen och anger hur väl regressionslinjen är anpassad. Ett lågt värde indikerar för en bättre anpassad kurva än ett högt värde. Tiden för en 5 log₁₀ reduktion är beräknad från dag 0

	k (log ₁₀ /dag)	n (enhetlös)	Lagtid (dagar)	Tid för 5 log ₁₀ reduktion (dagar)	SSE
<i>E. faecalis</i> och <i>E. faecium</i> i naturligt avloppsvatten	-0,060620 SE 0,006	0,331159 0,113	5	88	0,68
Övriga enterokocker i naturligt avloppsvatten	-0,108670 SE 0,016	0,980919 0,148	9	55	2,03
	-0,173603	0,389108	2	31	0,41

Enterokocker i naturligt klosett vatten	SE	0,016	0,154			
<i>E. faecalis</i> isolerad från avloppsvatten		-0,080265	0,730182	9	72	0,72
	SE	0,006	0,087			
Oidentifierad blå från avloppsvatten		-0,058448	0,122851	2	88	1,63
	SE	0,008	0,123			
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		-0,077891	0,487318	6	71	2,29
	SE	0,010	0,172			
<i>E. faecium</i> NCTC 122042		-0,13057	2,38170	18	57	1,41
	SE	0,013	0,039			
<i>E. faecalis</i> 12697		-0,21006	3,39278	16	40	3,00
	SE	0,017	0,018			

6. Diskussion

6.1 Enterokocker i avlopp

6.1.1 SlaBa ger bättre selektivitet än VRE- för analys av avlopp

I detta arbete gav odling av avloppsvatten på VRE-agar utan Vankomycin i genomsnitt 35% fler kolonier jämfört med odling på SlaBa-agar, en skillnad som kan förklaras av en stor andel (ca 30%) falsk-positiva kolonier på VRE-agar. Dessa kolonier var typiska på VRE-, vidare test visade att de inte var enterokocker.

Skillnaden i selektivitet mellan medierna kan vara orsaken till att metoden med filteröverföring av kolonier från SlaBa till VRE- fungerade dåligt.

Enligt tillverkaren ska VRE ha en specificitet (utesluta andelen falsk-positiva resultat) till 90,4%. Dock är VRE avsett för att användas med tillsatt Vankomycin för att detektera Vankomycinresistenta enterokocker, vilket kan förklara den lägre specificiteten hos VRE- på 70% i denna studie. VRE- har använts vid undersökning av luftburna enterokocker med och utan resistens på sjukhus (Hsiao et al. 2014). Hsiao et al. (2014) visade att VRE- hade en specificitet på 81,3% vilket alltså var något högre jämfört med denna studie. Skillnaden kan bero på att det var olika material som undersöktes, luft jämfört med avloppsvatten. Avloppsvatten är ett utmanande material vad det gäller mediens specificitet i och med att det innehåller många olika bakterier av olika ursprung.

6.1.2 Vankomycinresistenta enterokocker förekommer i avlopp

I genomsnitt var koncentrationen av enterokocker 45 838 cfu/ml avloppsvatten, vilket är ca 4,6 till 46 gånger högre jämfört med tidigare svenska studier (Iversen et al. 2002; Bäckström et al. 2015).

Denna studie visade mer än 75 gånger högre koncentration Vankomycinresistenta enterokocker i inkommande avloppsvatten jämfört med Iversen et al. (2002). I denna studie detekterades de dessutom i 100% av proverna jämfört med i 60 % av proverna av Iversen et al. (2002).

Resultaten från dessa studier kan tyda på en ökad andel personer i samhället som bär på vancomycinresistenta enterokocker i mag-tarmkanalen eller urinvägarna.

Det saknas dock underlag för att dra några slutsatser om trender över tid. Skillnader i koncentration skulle kunna vara ett resultat av väder- och säsongsvariation. Till exempel sker utspädning vid hög nederbörd eller snösmältning, då en del av det dränerade dagvattnet leds till avloppssystemen. Högre koncentrationer i denna studie skulle också kunna förklaras med större andel anslutna hushåll med snålspolande toaletter, duschmunstycken och kranar idag jämfört med 2002.

Avloppsvattnet antogs vara mer utspädd än klosettvattnet, vilket även de inledande ammoniakmätningarna indikerade (Tabell 13). Dock var koncentrationen av enterokocker lägre i klosettvattnet jämfört med i avloppsvattnet och inga vankomycinresistenta enterokocker detekterades i klosettvattnet (detektionsgräns 1cfu/ml).

Skulle vankomycinresistenta enterokocker utgjort samma andel som i avlopp skulle det i klosettvattnet innebära en koncentration på ca 24 cfu/ml (SD = 1cfu). Att vankomycinresistenta enterokocker inte detekterades i klosettvattnet skulle kunna bero på inaktivering under långtidslagring men troligare är att ingen eller mycket få av personerna i hushållen där klosettvattnet samlades in hade vankomycinresistenta bakterier i mag-tarmkanalen eller urinblåsan. Förekomst av vankomycinresistenta enterokocker i klosettvattnet är troligtvis mer sporadisk jämfört med i avloppsvattnet.

Anledningen till att förekomsten av enterokocker studerades i blandat avloppsvatten i större utsträckning än klosettvattnet berodde främst på att arbetet utfördes med start i februari, och det klosettvattnet som fanns tillgängligt hade förvarats sedan oktober. Kompositionen av bakterier kan ha ändrats över tid och därför inte spegla sammansättningen i klosettvattnet när det lämnar hushållet. En annan anledning var att klosettvattnet, även om det är relativt stora mängder, kommer från färre hushåll än vid insamling av blandat avloppsvatten via ledningsnät. Då bärarskap av antibiotikaresistens vanligtvis är kopplat till behandling och/eller sjukhusvistelse bör förekomsten av vankomycinresistenta enterokocker i det blandade avloppsvattnet som användes i detta arbete vara mer representativ för samhället.

6.2 Ureahygienisering

6.2.1 Skillnad i inaktiveringsmönster kan påverka *E. faecalis* värde som indikatororganismer

E. faecalis 12697 hade en signifikant högre reduktion under försökstiden jämfört med de andra enterokockerna (Tabell 18). Skillnaden överraskade då det fanns ytterligare två stammar av *E. faecalis*, vilka antogs skulle ha liknande inaktiveringsmönster. Tidigare studier har visat en relativt jämn inaktivering av *E. faecalis* med avseende på olika inaktiveringsparametrar som temperatur och andel

adderad urea, dock användes enbart stammen *E. faecalis* ATCC 29212 i studierna (Fidjeland et al. 2013; Nordin et al. 2018). Inaktiveringsmönstret för *E. faecalis* ATCC 29212 (H) är i denna studie jämförbar med inaktiveringsmönstrena för de naturligt förekommande enterokockerna i avloppsvatten (D rosa), vilket indikerar att *E. faecalis* ATCC 29212 är ett bra val i labbstudier för att modellera inaktivering av naturligt förekommande fekala enterokocker.

Det skilde 32 dagar för att uppnå en 5 log₁₀ reduktion mellan den snabbaste och långsammaste stammen av *E. faecalis* (Tabell 18). Det finns inte någon bestämd behandlingstid för ureabehandling av klosettatten, därför skulle valet av stam av *E. faecalis* som indikatororganism eventuellt kunna påverka hygieniseringseffekten. Det finns inga lagstadgade krav på rening av avloppsfraktioner innan det sprids på åkermark, men då djurgödsel ska överlåtas mellan gårdar eller säljas till konsumenter finns krav på 5 log₁₀ reduktion av *E. faecalis* (ABP förordning EG nr 142/2011). Därför har tiden för 5 log₁₀ reduktion av de undersökta stammarna använts i detta arbete. En upprepning av denna studie skulle visa om den avvikande inaktiveringen av *E. faecalis* 12697 berodde på mänskliga faktorer, eller om skillnad mellan stammarna kommer att upprepa sig. Om upprepade försök visar stora skillnader i inaktiveringsmönster hos *E. faecalis* kan eventuellt *E. faecium* vara ett bättre alternativ som indikatororganism. *E. faecium* uppnådde 5 log₁₀ reduktion något snabbare än medelvärdet för stammarna av *E. faecalis* (Tabell 18), vilket kan passa bra då enterokocker ska indikera förekomsten av gramnegativa bakterier som inaktiveras snabbare. Endast en stam av *E. faecium* undersöktes i denna studie, fler stammar hade behövt jämföras för att se om de är mer stabila i inaktiveringsmönstret än *E. faecalis*.

6.2.2 Hygieniseringsmönster

Flera av de studerade enterokockerna ökade något i koncentration mellan dag 6 och 12 (se bilaga 1 för rådata). En tillväxt av enterokocker i kväverika miljöer har observerats även i andra studier (Dang et al. 2011), och kan ske initialt vid ureahygenisering då bakterierna får tillgång till kväve. Dock visar samtliga provlösningar i denna studie en minskande koncentration av enterokocker över tid vilket tyder på effektiv behandling för samtliga testade stammar av enterokocker.

Den oidentifierade blå stammen isolerad ur avloppsvatten (G) tillhörde en annan art än *E. faecalis* eller *E. faecium* och var den enda stammen i studien som potentiellt var av icke-fekalt ursprung. Hygieniseringsmönstret för den oidentifierade blå var mycket likt de naturligt förekommande *E. faecalis* och *E. faecium* i avloppsvattnet, därför vore det intressant att undersöka om den blå stammen var en enterokock med fekalt ursprung.

I en tidigare studie undersöktes inaktiveringsmönstret av *Enterococcus* spp. vid bland annat 1% ureabehandling (10°C) (Fidjeland et al. 2013), samma ekvation användes för regressionsanpassning som har använts i denna studie. Fidjeland et al.

(2013) visade att det förekom ett samband mellan hög temperatur och kort lagfas, och att inaktivering av enterokocker inte hade någon lagtid vid NH_3 -koncentrationer $>20\text{mM}$. I detta försök förekom lagfas vid inaktivering av samtliga enterokockstammar (Tabell 18), trots koncentrationer av $\text{NH}_3 >20\text{mM}$ och en högre behandlingstemperatur (14°C). Dock hade Fidjeland et al. (2013) lägre värden för inaktiveringskonstanten jämfört med alla enterokocker i detta försök utom *E. faecalis* och *E. faecium* i naturligt avloppsvatten (D rosa) samt den oidentifierade blå enterokocken (G). Den effektivaste behandlingen (2% tillsatt urea, 10°C) skulle enligt Fidjeland et al. (2013) ta 83 dagar för en $5 \log_{10}$ reduktion av *Enterococcus* spp., vilket är likvärdigt med det intervall av tid för $5 \log_{10}$ reduktion som har beräknats i denna studie (Tabell 18).

Klosettvattnet användes i huvudsak för studier av ureabehandling då det är den avloppsfraktionen som är aktuell att återföra på åkermark som gödning, och detta arbete syftar till att öka kunskapsbasen kring hygienisering av klosettvattnet med urea vilket är en etablerad metod.

6.2.3 pH och andel nedbruten urea påverkade koncentrationen av NH_3

Vid mätningar i slutet av försöket skilde andelen nedbruten urea samt koncentrationen av NH_3 mellan lösningarna (Tabell 15).

Skillnaden i nedbruten urea och det initialt höga pH-värdet i det autoklaverade klosettvattnet skapade olika förutsättningar för hygienisering jämfört med naturliga förhållanden (klosettvattnet som inte är autoklaverat). Dock tillåter försöket jämförelse av de olika stammarna tillsatta till autoklaverat klosettvattnet då pH och ureanedbrytning var liknade (Tabell 15).

Var för sig hade varken pH (vilket påverkade $f(\text{NH}_3)$) eller andelen nedbruten urea en tydlig koppling till koncentrationen av NH_3 , då det fanns värden som avvek från trenderna i båda grupperna (Tabell 15). Därför dras slutsatsen att de var likvärt viktiga för koncentrationen av NH_3 , där en liten andel nedbruten urea kunde kompenseras av ett högre pH-värde (och vice versa).

Startkoncentrationen av NH_3 utgjorde en liten del av total NH_3 i materialet när urean brutits ned, därför antogs startkoncentrationens påverkan på hygieniseringen varit liten.

Vid autoklaveringen avdödas de mikroorganismer som normalt utsöndrar ureas, och extracellulärt ureas denatureras, därför hade proverna med naturligt klosett- och avloppsvatten (D och E) en fördel vid nedbrytningen av urea då de hade kvar mikroorganismer och naturligt förekommande ureas.

Det tillsatta ureaset skulle kunna ha påverkats av det höga pH-värdet (9,63) i det autoklaverade klosettvattnet. En del ureas kan vara känsligt för höga pH-värden (Kabdaşli et al. 2006), och pH-värden >7 kan bidra till en långsammare nedbrytning av urea (Fidaleo & Lavecchia 2003).

Eventuellt bryts urea ned snabbare i färskt klosettwater jämfört med då det är långtidslagrat, då färskt klosettwater förmodligen har högre koncentration av både enterokocker och andra bakterier varav en del utsöndrar ureas. Färskt klosettwater har därmed potential att kunna bryta ned urea i större utsträckning än vad som gjordes i någon av lösningarna i denna studie, vilket kan leda till en snabbare och effektivare hygienisering av enterokocker. En effektivare nedbrytning hade kunnat medföra ett minskat behov av tillsatt urea, och därmed en billigare behandling än i dagsläget.

På grund av stora skillnader i andelen nedbruten urea hade det varit intressant att studera funktionen av ureas närmare. Det ureas som produceras naturligt av mikroorganismer i avföring är eventuellt mer potent än det ureas som tillsattes manuellt. Om det finns skillnader kan det vara intressant vid upplägg av framtida studier. Skillnaden i nedbrytning hade kunnat undersökas genom att addera kontroller av naturligt klosett- och avloppsvatten utan tillsatt ureas.

För att jämföra hygieniseringsmönster vid ureabehandling mellan fekala- och icke-fekala enterokocker i syfte att undersöka deras värde som indikatororganismer hade stammar med bekräftat icke-fekalt ursprung behövt användas i framtida studier.

7. Slutsats

- Största andelen enterokocker i både avloppsvatten (77%) och klosettvaften (99,3%) bestod av *E. faecalis* och *E. faecium*.
- Lagring av klosettvaften under lång tid verkar kunna bidra till en minskad koncentration av enterokocker men även minskad ureas-aktivitet.
- Andelen vankomycinresistenta enterokocker i avloppsvatten (0,24% av totala populationen) kan tyda på en ökning av vankomycinresistenta enterokocker i avloppsvattnet i Uppsala.
- I klosettvaften detekterades inga vankomycinresistenta enterokocker med detektionsgräns 1cfu/ml.
- De olika stammarna av enterokocker inaktiverades olika snabbt, vilket innebar att det skiljde 33 dagar för 5 log₁₀ reduktion mellan stammarna av *E. faecalis* som hygieniseras snabbast och långsammast.
- Med ureabehandling 1%, 14 °C i 88 dagar kan 5 log₁₀ reduktion uppnås för samtliga undersökta enterokocker.

Referenser

- Andersson, K. & Castor, M. (2005). *Behandling av svartvatten och matavfall med anaerob membranbioreaktor och omvänd osmos*. Lund. <https://sjostad.ivl.se/download/18.6579ab6011d9b20740f8000480557/1350483754801/PP25.pdf> [2023-01-19]
- de Boer, M.A., Wolzak, L. & Slootweg, J.C. (2019). Phosphorus: Reserves, Production, and Applications. I: Ohtake, H. & Tsuneda, S. (red.) *Phosphorus Recovery and Recycling*. Singapore: Springer. 75–100. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8031-9_5
- Bäckström, M., Alexandersson, S., Bäcklund, I., Lindgren, P.-E. & Skredsvik-Raudberget, C. (2015). *UV-behandling av avloppsvatten – utvärdering av två svenska fullskaleanläggningar*. <https://vattenbokhandeln.svensktvatten.se/produkt/uv-behandling-av-avloppsvatten-utvardering-av-tva-svenska-fullskaleanlaggningar/> [2023-01-19]
- Bäckström, M., Jönsson, R., Mäki, A., Sjöstrand, A. & Wikström, A.-S. (2013). Metoder för att förhindra mikrobiell avloppspåverkan på råvatten. [2023-02-13]
- Chen, Q., An, X., Li, H., Su, J., Ma, Y. & Zhu, Y.-G. (2016). Long-term field application of sewage sludge increases the abundance of antibiotic resistance genes in soil. *Environment International*, 92–93, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.026>
- CHROMagar™ (u.å.). *VRE*. *Chromagar*. <https://www.chromagar.com/en/product/chromagar-vre/> [2023-02-08]
- Dang, S.T.T., Van Truong, D., Madsen, H. & Dalsgaard, A. (2011). Survival of faecal indicator bacteria in treated pig manure stored in clay-covered heaps in Vietnam. *Veterinary Microbiology*, 152 (3), 374–378. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.004>
- Davies, J. & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- DiazGranados, C.A., Zimmer, S.M., Klein, M. & Jernigan, J.A. (2005). Comparison of mortality associated with vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococcal bloodstream infections: a meta-analysis. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 41 (3), 327–333. <https://doi.org/10.1086/430909>
- Edmeades, D.C. (2003). The long-term effects of manures and fertilisers on soil productivity and quality: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 66 (2), 165–180. <https://doi.org/10.1023/A:1023999816690>
- FAO (2022). *Regulation (EU) 2020/741 of the European Parliament and of the Council on minimum requirements for water reuse*. | FAOLEX. Food and Agriculture Organization of the United Nations. <https://www.fao.org/faolex/results/details/en/c/LEX-FAOC195719/> [2023-02-13]

- Fidaleo, M. & Lavecchia, R. (2003). Kinetic Study of Enzymatic Urea Hydrolysis in the pH Range 4-9. *Chem Biochem Eng Q*, 17
- Fidjeland, J., Lalander, C., Jönsson, H. & Vinnerås, B. (2013). Ammonia sanitisation of sewage sludge using urea. *Water Science and Technology*, 68 (8), 1866–1872. <https://doi.org/10.2166/wst.2013.443>
- Folkhälsomyndigheten (2014). *Vancomycinresistent enterokocker - VRE - Kunskapsunderlag samt Folkhälsomyndighetens rekommendationer för att begränsa smittspridning med VRE*. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/publikationer-och-material/publikationsarkiv/v/vankomycinresistent-enterokocker-vre/#:~:text=Detta%20kunskapsunderlag%20inne%C3%A5ller%20rekommendationer%20referensmetodik,%C3%A5tg%C3%A4rder%20f%C3%B6r%20att%20begr%C3%A4nsa%20smittspridning.> [2023-01-18]
- García-Solache, M. & Rice, L.B. (2019). The Enterococcus: a Model of Adaptability to Its Environment. *Clinical Microbiology Reviews*, 32 (2), e00058-18. <https://doi.org/10.1128/CMR.00058-18>
- Gryaab (u.å.). *Slam. Gryaab*. <https://www.gryaab.se/vad-vi-gor/slam/> [2023-05-30]
- Hegstad, K., Mikalsen, T., Coque, T.M., Werner, G. & Sundsfjord, A. (2010). Mobile genetic elements and their contribution to the emergence of antimicrobial resistant Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. *Clinical Microbiology and Infection*, 16 (6), 541–554. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03226.x>
- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., Guerin, P.J. & Piddock, L.J.V. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, 387 (10014), 176–187. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0)
- Hsiao, P.-K., Cheng, C.-C., Chang, K.-C., Yiin, L.-M., Hsieh, C.-J. & Tseng, C.-C. (2014). Performance of CHROMagar VRE Medium for the Detection of Airborne Vancomycin-Resistant/Sensitive Enterococcus Species. *Aerosol Science and Technology*, 48 (2), 173–183. <https://doi.org/10.1080/02786826.2013.865833>
- Iversen, A., Kühn, I., Franklin, A. & Möllby, R. (2002). High Prevalence of Vancomycin-Resistant Enterococci in Swedish Sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 68 (6), 2838–2842. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2838-2842.2002>
- Johansson, M., Jönsson, H. & Magnusson, S. (2021). *Ökad cirkularitet och minskad övergödning - potentialen i svenskt lantbruk och livsmedelskedja*. https://pub.epsilon.slu.se/26868/1/johansson_m_et_al_220201.pdf [2023-02-15]
- Jönsson, H. (2019). Fosfor, kväve, kalium och svavel – tillgång, sårbarhet och återvinning från avlopp. *Rapport (Institutionen för energi och teknik, SLU)*, (105). <https://res.slu.se/id/publ/102301> [2023-02-06]
- Jönsson, H., Stintzing, A.R., Ecology, V., Vinnerås, B. & Salomon, E. (2004). Guidelines on the Use of Urine and Faeces in Crop Production. http://www.ecosanres.org/pdf_files/ESR_Publications_2004/ESR2web.pdf [2023-02-06]
- Kabdaşlı, I., Tünay, O., İşlek, C., Erdinç, E., Hüskalar, S. & Tatli, M.B. (2006). Nitrogen recovery by urea hydrolysis and struvite precipitation from anthropogenic urine. *Water Science and Technology: A Journal of the International Association on Water Pollution Research*, 53 (12), 305–312. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.433>
- Kacica, M. (2004). *Brief Report: Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*. New York.

- <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5315a6.htm> [2023-03-03]
- Karkman, A., Pärnänen, K. & Larsson, D.G.J. (2019). Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nature Communications*, 10 (1), 80. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07992-3>
- KOMMISSIONENS FÖRORDNING (EU) nr 142/2011 av den 25 februari 2011, om genomförande av Europaparlamentets och rådets förordning (EG) nr 1069/2009 om hälsobestämmelser för animaliska biprodukter och därav framställda produkter som inte är avsedda att användas som livsmedel och om genomförande av rådets direktiv 97/78/EG vad gäller vissa prover och produkter som enligt det direktivet är undantagna från veterinärkontroller vid gränsen
- Lebreton, F., Willems, R.J.L. & Gilmore, M.S. (2014). Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization. I: Gilmore, M.S., Clewell, D.B., Ike, Y., & Shankar, N. (red.) *Enterococci: From Commensals to Leading Causes of Drug Resistant Infection*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190427/> [2023-01-17]
- Manero, A. & Blanch, A.R. (1999). Identification of Enterococcus spp. with a Biochemical Key. *Applied and Environmental Microbiology*, 65 (10), 4425–4430
- Motlagh, A.M. & Yang, Z. (2019). Detection and occurrence of indicator organisms and pathogens. *Water Environment Research*, 91 (10), 1402–1408. <https://doi.org/10.1002/wer.1238>
- Nationalencyklopedin (u.å.a). *Konjugation - Uppslagsverk - NE.se*. <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/1%C3%A5ng/konjugation> [2023-02-08]
- Nationalencyklopedin (u.å.b). *Plasmider - Uppslagsverk - NE.se*. <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/1%C3%A5ng/plasmider> [2023-02-08]
- Nationalencyklopedin (u.å.c). *Urea - Uppslagsverk - NE.se*. <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/1%C3%A5ng/urea> [2023-01-27]
- Nationalencyklopedin (u.å.d). *växtnäringsämnen - Uppslagsverk - NE.se*. <https://www.ne.se/uppslagsverk/encyklopedi/1%C3%A5ng/v%C3%A4xtn%C3%A4rings%C3%A4mnen> [2023-02-15]
- Naturvårdsverket (2013). *Hållbar återföring av fosfor - Naturvårdsverkets redovisning av ett uppdrag från regeringen*. (6580). Bromma. <https://miljobarometern.stockholm.se/content/docs/tema/kemikalier/slam/Hallbar-aterforing-av-fosfor-NV-2013.pdf> [2023-02-15]
- Noble, W.C., Virani, Z. & Cree, R.G.A. (1992). Co-transfer of vancomycin and other resistance genes from Enterococcus faecalis NCTC 12201 to Staphylococcus aureus. *FEMS Microbiology Letters*, 93 (2), 195–198. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1992.tb05089.x>
- Nordin, A. (2010). *Ammonia Sanitisation of Human Excreta - Treatment Technology for Production of Fertiliser*. Uppsala. [2023-01-19]
- Nordin, A. (2018). *Ammoniakygienisering av källsorterade avloppsfraktioner från svenska hushåll - Ett underlag inför uppdatering av SPCR 178 "System för kvalitetssäkring av fraktioner från små avlopp"*. (218:19). Malmö.
- Nordin, A., Götttert, D. & Vinnerås, B. (2018). Decentralised black water treatment by combined auto-thermal aerobic digestion and ammonia – A pilot study optimising treatment capacity. *Journal of Environmental Management*, 207, 313–318. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2017.10.064>
- Nordin, A., Niwagaba, C., Jönsson, H. & Vinnerås, B. (2013). Pathogen and indicator inactivation in source-separated human urine heated by the sun.

- Journal of Water, Sanitation and Hygiene for Development*, 3 (2), 181–188. <https://doi.org/10.2166/washdev.2013.174>
- Ottoson, J., Nordin, A., von Rosen, D. & Vinnerås, B. (2008). Salmonella reduction in manure by the addition of urea and ammonia. *Bioresource Technology*, 99 (6), 1610–1615. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.04.009>
- Ray, H., Saetta, D. & Boyer, T.H. (2017). Characterization of urea hydrolysis in fresh human urine and inhibition by chemical addition. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 4 (1), 87–98. <https://doi.org/10.1039/C7EW00271H>
- Region Stockholm (2018). VRE - information till patienter och närstående. <https://vardgivarguiden.se/globalassets/kunskapsstod/smittskydd/publikationer/vre---information-till-patienter-och-narstaende.pdf?IsPdf=true> [2023-03-08]
- Rosco Diagnostica (2009). Diatabs - Users Guide. Diagnostic Tablets for Bacterial Identification. [https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Users%20Guide\(2\).pdf](https://www.rosco.dk/gfx/pdf/Diatabs%20-%20Users%20Guide(2).pdf) [2023-05-09]
- Rutgersson, C., Ebmeyer, S., Lassen, S.B., Karkman, A., Fick, J., Kristiansson, E., Brandt, K.K., Flach, C.-F. & Larsson, D.G.J. (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>
- Sahlström, L., Rehbinder, V., Albihn, A., Aspan, A. & Bengtsson, B. (2009). Vancomycin resistant enterococci (VRE) in Swedish sewage sludge. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51 (1), 24. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-24>
- SCB (2020). *Användning av kväve (N) och fosfor (P) från stall- och mineralgödsel 2018/19*. Statistiska Centralbyrån. <https://www.scb.se/hitta-statistik/statistik-efter-amne/miljo/godselmedel-och-kalk/godselmedel-och-odlingsatgarder-i-jordbruket/pong/tabell-och-diagram/godselmedel/anvandning-av-kvave-n-och-fosfor-p-fran-stall--och-mineralgodsel/> [2023-02-15]
- Sghir, A., Gramet, G., Suau, A., Rochet, V., Pochart, P. & Dore, J. (2000). Quantification of Bacterial Groups within Human Fecal Flora by Oligonucleotide Probe Hybridization. *Applied and Environmental Microbiology*, 66 (5), 2263–2266. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2263-2266.2000>
- Svenskt Vatten (2022). *Avloppsfakta*. *Svenskt Vatten*. <https://www.svensktvatten.se/fakta-om-vatten/avloppsfakta/> [2023-02-06]
- Sörme, L. & Lagerkvist, R. (2002). Sources of heavy metals in urban wastewater in Stockholm. *Science of The Total Environment*, 298 (1), 131–145. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(02\)00197-3](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(02)00197-3)
- Tedim, A.P., Ruiz-Garbajosa, P., Corander, J., Rodríguez, C.M., Cantón, R., Willems, R.J., Baquero, F. & Coque, T.M. (2015). Population Biology of Intestinal Enterococcus Isolates from Hospitalized and Nonhospitalized Individuals in Different Age Groups. *Applied and Environmental Microbiology*, 81 (5), 1820–1831. <https://doi.org/10.1128/AEM.03661-14>
- Uppsala vatten (2021). *Miljörapport 2021 - Kungsängsverket*. Uppsala. https://www.uppsalavatten.se/download/18.50f686c4182e8f93c11239f/1663932328850/miljorapport-kungsangsverket-2021_v2.pdf [2023-02-22]
- VUMICRO (2022). Arabinose fermentation test - Virtual Microbiology Lab Simulator Software. <https://vumicro.com/docs/arabinose-fermentation-test/> [2023-05-09]
- Weigel, L.M., Clewell, D.B., Gill, S.R., Clark, N.C., McDougal, L.K., Flannagan, S.E., Kolonay, J.F., Shetty, J., Killgore, G.E. & Tenover, F.C. (2003). Genetic Analysis of a High-Level Vancomycin-Resistant Isolate of

- Staphylococcus aureus. *Science*, 302 (5650), 1569–1571.
<https://doi.org/10.1126/science.1090956>
- WHO (2020). *Antibiotic resistance*. World Health Organisation.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
[2023-02-08]
- Willems, R.J.L., Top, J., van Santen, M., Robinson, D.A., Coque, T.M., Baquero, F., Grundmann, H. & Bonten, M.J.M. (2005). Global Spread of Vancomycin-resistant Enterococcus faecium from Distinct Nosocomial Genetic Complex. *Emerging Infectious Diseases*, 11 (6), 821–828.
<https://doi.org/10.3201/eid1106.041204>
- Winker, M., Vinnerås, B., Muskolus, A., Arnold, U. & Clemens, J. (2009). Fertiliser products from new sanitation systems: Their potential values and risks. *Bioresource Technology*, 100 (18), 4090–4096.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.024>
- Zrimec, J. & Lapanje, A. (2018). DNA structure at the plasmid origin-of-transfer indicates its potential transfer range. *Scientific Reports*, 8 (1), 1820.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-20157-y>
- Özsoy, S. & İlki, A. (2017). Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) in stool specimens submitted for Clostridium difficile toxin testing. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48 (3), 489–492.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.12.012>

Populärvetenskaplig sammanfattning

Tillförsel av växtnäring på åkermark är nödvändig för matproduktionen. En återförsel av mänskliga fekalier och urin via källsorterat toalettavfall (klosettavloppsvatten) ökar cirkulationen av näring, bidrar till förbättrad jordhälsa och minskar risken för övergödning i vattendrag. Antibiotikaresistenta bakterier och andra patogener förekommer i mänsklig avföring då människor är sjuka. Därför finns en potentiell risk med användningen av klosettavloppsvatten som gödningsmedel, då det skulle kunna innebära att antibiotikaresistenta bakterier och andra patogener (som gör människor sjuka) sprids i naturen.

Inom bakteriesläktet enterokocker finns arter som bär på resistens mot bland annat antibiotikumet Vankomycin. Ett sätt att förhindra spridning av vankomycinresistenta enterokocker och patogener i naturen är om klosettavloppet hygieniseras innan det används som gödsel på åkermark. Vid en hygienisering avdödas bakterier och andra patogener. En vanlig hygieniseringsmetod är att tillsätta urea till klosettavloppet. Urea bryts ned till NH_3 , vilket över tid dödar bakterier och andra mikroorganismer vid tillräckligt höga doser.

Släktet enterokocker används ofta som indikatororganismer, vilket är när förekomsten av en utvald art eller släkte av en organism (i detta fall bakterier) studeras för att kontrollera till exempel effekten av en hygieniseringsmetod. Det har diskuterats om enterokocker som släkte är dåliga som indikatororganismer vid ureahygienisering, då det förekommer arter med hög tåligghet mot NH_3 som kan visa på större (och dyrare) behov av hygienisering av klosettavloppet än vad som faktiskt är nödvändigt. Eventuellt är det bättre att isolera enskilda arter i stället, till exempel *E. faecalis* som har fekalt ursprung.

I detta arbete undersöktes enterokockers förekomst i avloppsvatten och klosettavloppet samt hur många av dem som bär på vankomycinresistens, syftet var att samla grundläggande information om enterokocker i avlopp. Det undersöktes även om det finns skillnad i avdödningshastighet mellan naturligt förekommande enterokocker i klosettavloppet och avloppsvatten, samt 5 isolerade stammar av enterokocker vid 1% tillsatt urea vid 14°C , vilket i så fall skulle kunna påverka deras värde som indikatororganismer.

I Sverige finns idag inga krav på att klosettavloppet ska hygieniseras innan det sprids på åkermark, men då djurgödsel överläts mellan gårdar eller säljs till konsumenter är 5 \log_{10} reduktion (vilket betyder att 99,999% inaktiveras) av enterokocker ett krav, därför har det varit nivån av inaktivering som undersöks i denna studie.

Resultaten visade bland annat att 0,24% av enterokockerna i Uppsalas avloppsvatten bär på resistens mot Vankomycin. En jämförelse med tidigare studier indikerar att andelen Vankomycinresistenta enterokocker kan ha ökat i avloppsvattnet i Uppsala sedan 2002. Resultaten visade även att inaktiveringshastigheten var olika för olika stammar av enterokocker. Det skilde 33 dagar mellan den snabbaste och långsammaste stammen av *E. faecalis* att nå 5 \log_{10} reduktion. Det beräknades ta 88 dagar för en 5 \log_{10} reduktion av samtliga undersökta stammar av enterokocker i detta arbete. Eftersom det inte finns någon bestämd tid för hur länge klosettavloppet ska hygieniseras med urea, kan valet av enterokockstam eventuellt påverka hygieniseringseffekten.

Tack

Stort tack till Jonas och Lovisa på Kungsängsverket i Uppsala för all hjälp med provtagningar av avloppsvatten, och stort grattis till cheferna på Kungsängsverket som har fått tag i så bra personal! Trevligare och kunnigare personer kan man knappt önska sig.

Tack även till min sambo William som har stöttat mig med choklad och glada tillrop i stressade stunder, och som har dragit ett stort lass på hemmaplan för att jag ska kunna genomföra detta arbete. Tack till min dotter Signe för att du är världens bästa unge.

Sist men inte minst vill jag rikta ett enormt tack till min handledare Annika Nordin som har haft smarta svar på alla mina dumma frågor och ställt upp med hjälp i ur och skur. Du har lärt mig massor, och detta arbete hade inte varit i närheten lika bra utan all din hjälp!

Bilaga 1

Cfu och procentuell fördelning av Enterokocker i avloppsvatten

	07-mar			14-mar			21-mar		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
E. faecalis och E. faecium (rosa)	32 500	69 000	30 500	51 333	29 500	10 500	23 000	57 000	18 000
Övriga enterokocker (blå)	30 000	10 000	15 000	9 633	3 000	12 150	1 600	5 300	3 850
Resistent E. faecalis och E. faecium	50	0	0	20	30	70	100	10	0
Resistent övriga enterokocker	10	0	0	75	150	60	105	0	0
E. faecalis och E. faecium	51,95%	87,34%	67,03%	84,07%	90,27%	46,09%	92,72%	91,48%	82,38%
Övriga enterokocker	47,95%	12,66%	32,97%	15,78%	9,18%	53,34%	6,45%	8,51%	17,62%
Resistent E. faecalis och E. faecium	0,08%	0,00%	0,00%	0,03%	0,09%	0,31%	0,40%	0,02%	0,00%
Resistent övriga enterokocker	0,02%	0,00%	0,00%	0,12%	0,46%	0,26%	0,42%	0,00%	0,00%
Totala cfu	62 560	79 000	45 500	61 061	32 680	22 780	24 805	62 310	21 850

Medelvärden i avloppsvatten				
	07-mar	14-mar	21-mar	Medel
E. faecalis och E. faecium	44 000	30 444	32 667	35 704
Övriga enterokocker	18 333	8261	3583	10 059
Resistenta E. faecalis och E. faecium	16,67	40	36,67	31
Resistenta Övriga enterokocker	3,33	95	35	44
E. faecalis och E. faecium	68,77%	73,48%	88,86%	77,04%
Övriga enterokocker	31,19%	26,10%	10,86%	22,72%
Resistenta E. faecalis och E. faecium	0,03%	0,14%	0,14%	0,10%
Resistenta övriga enterokocker	0,01%	0,28%	0,14%	0,14%
Totala cfu	62 353 ,33	38 840 ,33	36 321 ,67	45 838 ,44

Standardavvikelse			
	07-mar	14-mar	21-mar
E. faecalis och E. faecium	17 696 ,52	16 683 ,37	17 326 ,92
Övriga enterokocker	8498,37	3859,40	1522,24
Resistenta E. faecalis och E. faecium	23,57	21,60	44,97
Resistenta övriga enterokocker	4,71	39,37	49,50

8. Bilaga 2

Avloppsvatten

	Medel cfu dag 0			Medel cfu dag 6		
	log	logred		log	logred	
D rosa	17 000	4,23	0	7 217	3,85833665	-0,3716634
D blå	2 200	3,342423	0	1 800	3,25527251	-0,0871505
E	8 600	3,3945	0	2 233	3,34895355	-0,0455465
F	9 900 000	6,9956	0	5 300 000	6,72427587	-0,2713241
G	16 400 000	7,21484	0	6 033 333	6,78055732	-0,4342827
H	10 550 000	7,02325	0	3 133 333	6,4960066	-0,5272434
I	8 950 000	6,9518	0	6 300 000	6,79934055	-0,1524595
J	10 700 000	7,0294	0	5 866 667	6,76839141	-0,2610086

	Medel cfu dag 12			Medel cfu dag 19		
	log	logred		log	logred	
D rosa	6 000	3,7781513	-0,4518487	3 200	3,50514998	-0,72485
D blå	900	2,9542425	-0,3881805	433	2,6364879	-0,70594
E	208	2,3187588	-1,0757412	<10	1	-2,3945
F	4 233 333	6,6266825	-0,3689175	1 456 667	6,16336028	-0,83224
G	4 900 000	6,6901961	-0,5246439	1 986 667	6,29812508	-0,91671
H	3 166 667	6,5006024	-0,5226476	1 046 667	6,01980853	-1,00344
I	9 066 667	6,9574476	0,0056476	3 236 667	6,51009802	-0,4417
J	6 466 667	6,8106805	-0,2187195	1 780 000	6,25042	-0,77898

	Medel cfu dag 26			Medel cfu dag 33		
	log	logred		log	logred	
D rosa	1 233	3,091080469	-1,138919531	518	2,71460914	-1,5153909
D blå	27	1,431363764	-1,911059236	<10	1	-2,342423
E	<10	1	-2,3945	<10	1	-2,3945
F	613 333	5,787696568	-1,207903432	203 333	5,30820858	-1,6873914
G	583 333	5,765916794	-1,448923206	706 667	5,84921461	-1,3656254
H	753 333	5,876987184	-1,146262816	180 000	5,25527251	-1,7679775
I	876 667	5,942834494	-1,008965506	280 000	5,44715803	-1,504642
J	180 000	5,255272505	-1,774127495	5 333	3,72699873	-3,3024013

	Medel cfu dag			
	40	log	logred	
D rosa	97	1,98527674	-2,24472	
D blå	<10	1	-2,34242	
E	<10	1	-2,3945	
F	19 667	4,29373076	-2,70187	
G	63 333	4,80163235	-2,41321	
H	11 000	4,04139269	-2,98186	
I	9 667	3,98527674	-2,96652	
J	200	2,30103	-4,72837	

Klosettwater

	L	M	N	medel	SD
Cfu rosa	10 150	9100	10 033	9 761	469,8319
Andel rosa	99%	100%	99%	99,33%	
Cfu blå	100	0	100	66,66667	47,14045
Cfu tot	10 250	9 100	10 133	9 828	516,7503
Andel blå	1%	0%	1%	0,67%	

Avloppsvatten

cfu	dag 0	dag 6	dag 12	dag 19	dag 26	dag 33	dag 40
D1 rosa	17 000	4 700	5 800	3 600	1 445	515	120
D1 blå	2 200	2 000	800	200	30	0	0
D2 rosa	17 000	8 400	5 000	3 600	1 455	755	120
D2 blå	2 200	2 100	900	900	5	0	0
D3 rosa	17 000	8 550	7 200	2 400	800	285	50
D3 blå	2 200	1 300	1 000	200	5	0	0
E1	8 600	1 300	140	0	0	0	0
E2	8 600	750	310	0	0	0	0
E3	8 600	4 650	175	0	0	0	0
F1	9 900 000	5 300 000	4 400 000	1 830 000	310 000	170 000	27 000
F2	9 900 000	dålig platta	3 700 000	900 000	790 000	220 000	16 000
F3	9 900 000	dålig platta	4 600 000	1 640 000	740 000	220 000	16 000
G1	16 400 000	8 400 000	6 900 000	2 500 000	630 000	770 000	16 000
G2	16 400 000	6 800 000	3 500 000	1 530 000	420 000	1 000 000	70 000
G3	16 400 000	2 900 000	4 300 000	1 930 000	700 000	350 000	104 000
H1	10 550 000	2 800 000	2 900 000	1 390 000	690 000	150 000	3 000
H2	10 550 000	2 600 000	2 200 000	1 040 000	610 000	160 000	15 000
H3	10 550 000	4 000 000	4 400 000	710 000	960 000	230 000	15 000
I1	8 950 000	5 400 000	7 900 000	2 040 000	690 000	450 000	19 000
I2	8 950 000	6 500 000	6 000 000	4 080 000	1 030 000	280 000	3 000
I3	8 950 000	7 000 000	13 300 000	3 590 000	910 000	110 000	7 000
J1	10 700 000	7 000 000	6 800 000	1 270 000	140 000	1 000	200
J2	10 700 000	6 500 000	6 800 000	1 950 000	60 000	2 000	0
J3	10 700 000	4 100 000	5 800 000	2 120 000	340 000	13 000	400

9. Bilaga 3

Efter tillsats av urea och ureas

EC	dag 0	dag 19	dag 26	dag 33	dag 40
<i>Temp oC</i>	24,2	22,1	22,5	22	21,5
D1	9,160	11,540	17,610	17,880	17,950
D2	9,160	10,050	17,630	17,850	17,890
D3	9,160	10,920	17,750	17,880	17,780
E1	6,541	14,200	21,330	21,650	21,620
E2	6,541	13,070	21,280	21,560	21,500
E3	6,541	15,900	21,310	21,560	21,530
F1	3,890	8,192	8,602	9,036	9,356
F2	3,890	8,198	8,603	9,030	9,375
F3	3,890	8,025	8,406	8,820	9,150
G1	3,862	8,275	8,657	9,128	9,352
G2	3,862	8,266	8,650	9,085	9,403
G3	3,862	8,238	8,630	9,044	10,130
H1	4,211	9,981	10,040	10,480	10,770
H2	4,211	9,194	9,347	9,601	9,887
H3	4,211	9,215	9,285	9,550	9,746
I1	3,958	9,022	9,505	9,975	10,380
I2	3,958	9,043	9,455	9,984	10,350
I3	3,958	8,954	9,363	9,816	10,180
J1	3,858	9,428	9,911	10,430	10,830
J2	3,858	9,497	10,030	10,560	10,960
J3	3,858	9,238	9,716	10,250	10,630

Innan tillsatser dag 0, 24,4oC	EC	pH
Klosettatten rå	5,344	7,92
Avloppsvatten rå	1,279	7,76
Autoklaverat klosettatten	2,644	9,63

pH efter tillsats av urea och ureas

pH	dag 0	dag 33	dag 40
D1	9,16	9,51	9,32
D2	9,16	9,57	9,33
D3	9,16	9,58	9,31
E1	8,68	9,26	9,23
E2	8,68	9,3	9,26
E3	8,68	9,2	9,24
F1	9,47	9,36	9,37
F2	9,47	9,24	9,37
F3	9,47	9,38	9,37
G1	9,45	9,43	9,3
G2	9,45	9,33	9,35
G3	9,45	9,29	9,35
H1	9,4	9,29	9,35
H2	9,4	9,38	9,36
H3	9,4	9,32	9,36
I1	9,43	9,32	9,38
I2	9,43	9,28	9,38
I3	9,43	9,28	9,37
J1	9,47	9,26	9,35
J2	9,47	9,26	9,36
J3	9,47	9,53	9,37
medel			
pH	dag 0	dag 33	dag 40
D	9,16	9,5533333333	9,32
E	8,68	9,2533333333	9,2433333333
F	9,47	9,3266666667	9,37
G	9,45	9,35	9,3333333333
H	9,4	9,33	9,3566666667
I	9,43	9,2933333333	9,3766666667
J	9,47	9,35	9,36
SD pH	dag 0	dag 33	dag 40
D	0	0,030912062	0,008164966
E	0	0,041096093	0,012472191
F	0	0,061824123	0
G	0	0,058878406	0,023570226
H	0	0,037416574	0,004714045
I	0	0,018856181	0,004714045
J	0	0,127279221	0,008164966

10. Bilaga 4

	Ammoniak mg/l (NH- N)	ammoniak i gram/l	Urea (NH-N mg/l)	faktisk urea mg/l	g urea- N/L	nedbruten urea
D1	4586	4,585774	14871	10286	6,937992	66%
D2	4542	4,541951	17478	12936	8,154254	56%
D3	4525	4,525017	16017	11492	7,472261	61%
E1	5007	5,007002	19422	14415	9,061083	55%
E2	4902	4,902055	18541	13639	8,649871	57%
E3	5031	5,030759	18088	13057	8,438755	60%
F1	1914	1,91371	17446	15533	8,139269	24%
F2	1958	1,957619	17388	15431	8,112196	24%
F3	1792	1,792319	17085	15292	7,970566	22%
G1	1974	1,973981	17367	15393	8,102067	24%
G2	1962	1,961613	17118	15157	7,98632	25%
G3	1943	1,942578	18147	16205	8,466323	23%
H1	2334	2,333852	18096	15762	8,442222	28%
H2	2088	2,088404	17874	15786	8,338987	25%
H3	2083	2,082692	18367	16284	8,568601	24%
I1	2220	2,219708	18501	16281	8,631322	26%
I2	2296	2,295944	19698	17402	9,189977	25%
I3	2127	2,127353	19846	17719	9,258809	23%
J1	2248	2,248129	20092	17843	9,373357	24%
J2	2257	2,256578	20211	17954	9,428875	24%
J3	2243	2,243276	19272	17028	8,990888	25%

Publicering och arkivering

Godkända självständiga arbeten (examensarbeten) vid SLU publiceras elektroniskt. Som student äger du upphovsrätten till ditt arbete och behöver godkänna publiceringen. Om du kryssar i **JA**, så kommer fulltexten (pdf-filen) och metadata bli synliga och sökbara på internet. Om du kryssar i **NEJ**, kommer endast metadata och sammanfattning bli synliga och sökbara. Även om du inte publicerar fulltexten kommer den arkiveras digitalt. Om fler än en person har skrivit arbetet gäller krysset för samtliga författare. Du hittar en länk till SLU:s publiceringsavtal på den här sidan:

- <https://libanswers.slu.se/sv/faq/228316>.

JA, jag/vi ger härmed min/vår tillåtelse till att föreliggande arbete publiceras enligt SLU:s avtal om överlåtelse av rätt att publicera verk.

NEJ, jag/vi ger inte min/vår tillåtelse att publicera fulltexten av föreliggande arbete. Arbetet laddas dock upp för arkivering och metadata och sammanfattning blir synliga och sökbara.