Groen- en houtafval als bron van azolen-resistente schimmel Aspergillus fumigatus
Deel B monitoring

clm

Groen- en houtafval als bron van azolen-resistente schimmel *Aspergillus fumigatus* Deel B monitoring

Auteurs:

Opdrachtgever: RWS-VWL
Foto's kaft: Links: Aspergillus fumigatus,
Jos Houbraken, Westerdijk Fungal Biodiversity Institute
Rechts: gemengde afvalhoop,
CLM Onderzoek en Advies

© CLM, publicatienummer 1066, juni 2021

CLM Onderzoek en Advies

Postbus:
Postbus 62
4100 AB Culemborg

Bezoekadres:
Gutenbergweg 1
4104 BA Culemborg

T 0345 470 700
www.clm.nl

Voorwoord

De vondst van een resistente schimmel in hopen groenafval, wachtend op verwerking, leidde naar de vraag hoe we ons organisch afval precies verwerken.

Al eerder is ontdekt dat de oorzaak van dit probleem vrijwel zeker te maken heeft met de bestrijding van schimmels, met middelen die azolen bevatten. Niet alleen in de bollenteelt, ook bij het telen van andere gewassen, worden azolen ingezet als gewasbeschermingsmiddel. Ook biociden, bestemd voor de verduurzaming van hout, bevatten azolen.

Het Rijksinstituut voor Milieuhygiëne (RIVM), in samenwerking met CLM Onderzoek en Advies en het Radboud-Universitair Medisch Centrum (Radboud-UMC), constateerden in 2017, dat organisch afval, dat azolen bevat, een bron vormt voor het ontstaan van de resistente schimmel ***Aspergillus fumigatus***. Dit houdt in dat deze schimmel, die mensen kan besmetten, niet meer met reguliere medicijnen te genezen is. Tijdens dat onderzoek zijn al enkele condities voor de vorming van deze resistente schimmel in kaart gebracht, op zogenoemde hotspots. Om meer inzicht te krijgen in de locaties van deze hotspots, is het nodig om de behandeling van organisch afval onder de loep te nemen. Bovendien is het belangrijk om de hele keten in beeld te krijgen, niet alleen een enkele schakel daarbinnen. RWS-WVL heeft daarom opdracht gegeven om hier nader onderzoek naar te verrichten. Via interviews en een literatuuronderzoek heeft CLM eerst condities voor het ontstaan van resistente ***Aspergillus fumigatus*** in beeld gebracht (deel A). Aansluitend is een bemonsteringsonderzoek uitgevoerd, om de resultaten van de interviews en het literatuur-onderzoek te bevestigen of aan te vullen (is dit rapport, deel B).

In deze rapportage vindt u alle resultaten van het bemonsteringsonderzoek (deel B). Verschillende bedrijven en personen hebben medewerking verleend aan de bemonstering. Allen hartelijk dank voor de medewerking.

Utrecht, mei 2021

Senior juridisch medewerker RWS-WVL

Inhoud

Voorwoord **1**

Samenvatting **3**

Summary **10**

1 Inleiding **17**

2 Werkwijze **19**
2.1 Meetprogramma en werving bemonsteringslocaties 19
2.1.1 Meetprogramma groenafval 20
2.1.2 Meetprogramma afvalhout 20
2.1.3 Meetprogramma vergistingssector 20
2.2 Monstername 21
2.3 Analyse monsters 22
2.3.1 Azolen 22
2.3.2 (Resistente) Aspergillus fumigatus 23
2.4 Dataverwerking en -analyse 23
2.5 Bespreking bevindingen en advisering effectieve maatregelen 23

3 Resultaten **24**
3.1 Houtafval 24
3.2 Groenafval in kleine opslaghopen 27
3.2.1 Slootmaaisel 28
3.2.2 Bermmaaisel 29
3.2.3 Combinatie van groenafval 29
3.2.4 Twee a-typische situaties 30
3.3 Groenafval op gemeentewerven 32
3.4 Groenafval op biomassawerven 33
3.5 Land- en tuinbouwafval, GFT-afval en (co-)vergisting 36
3.6 Reflectie op de resultaten 39
3.6.1 sleutelfactoren en resistentie-ontwikkeling 39
3.6.2 Resistente Aspergillus fumigatus en aantallen CFU/g 41
3.6.3 Resistentiebepaling en heterogeniteit 41
3.6.4 Bewaren, omzetten en metingen in de lucht 41
3.6.5 Maatregelen en voorwaarden bollenteelt 42
3.6.6 Resistente Aspergillus in bewaarhopen en risico's voor patiënten 42

4 Conclusies en aanbevelingen **44**
4.1 Conclusies 44
4.2 Aanbevelingen 45
4.2.1 Praktijk 45
4.2.2 Verder onderzoek 46

Referenties 47

Samenvatting

Inleiding

Dit rapport beschrijft het monitoringsonderzoek naar azoolresistentie bij de schimmel ***Aspergillus fumigatus***, op een aantal locaties, waar opslag en verwerking van groenafval- en houtafval plaatsvindt. De opzet van het onderzoek en de selectie van locaties is gebaseerd op literatuur-onderzoek en interviews, zoals beschreven in deel A van het onderzoek 'Groen- en houtafval als bron van azolen-resistente schimmel' (CLM, publicatienummer 1065).

Azolen zijn een groep schimmelbestrijdingsmiddelen. Deze groep middelen heeft een breed toepassingsgebied: als gewasbeschermingsmiddel, als biocide voor houtverduurzaming en als (dier)geneesmiddel. ***Aspergillus fumigatus*** is een schimmel die groeit op dood plantmateriaal. Resistentie van ***A. fumigatus*** tegen azolen, ontstaat in zogenaamde 'hotspots'. Dit zijn plekken waar bijna altijd (soms in zeer lage concentraties) azolen aangetroffen worden en waar de omstandigheden voor de groei van ***A. fumigatus*** goed zijn: aanwezigheid van organisch materiaal, temperatuur tussen 12 en 60 graden Celsius (°C)[1], voldoende vocht en zuurstof. (Resistente) ***A. fumigatus*** vormt een risico voor patiënten met een verzwakt immuunsysteem**,** of met longinfecties of COVID**-**19. Door onderzoek van het DNA van de resistente ***A. fumigatus***, is aannemelijk gemaakt dat de schimmelsporen**,** die voor besmetting van patiënten zorgen, uit het milieu afkomstig zijn.

In deel A van de onderzoeksrapportage is aanbevolen om zowel groen-, hout- als overig land- en tuinbouwafval te monitoren. Voor het groenafval is geadviseerd om monsters te nemen mét en zonder agrarisch groenafval en te bemonsteren in afval van zowel biomassawerven[2] als lokale groenafvalhopen. Deze aanbevelingen zijn in deze monitoringsstudie invulling gegeven.

Werkwijze

Op basis van de aanbevelingen is een meetplan opgesteld, voor locaties waar de grootste kans op het ontstaan van resistentie van ***Aspergillus fumigatus*** wordt verwacht: de ketens van houtafval, groencompost en (co)-vergisting van land- en tuinbouwafval. Vervolgens is aan de beheerders van deze locaties toestemming gevraagd voor bemonstering en het verwerken van data. De bemonsteringslocaties zijn verspreid over Nederland gekozen, om ook eventuele regionale verschillen te kunnen constateren.

---

[1] Optimale temperatuur voor *Aspergillus fumigatus* ligt tussen 30 en 35 °C. De schimmel kan groeien in een brede temperatuurrange van 12-65 °C. Asexuele sporen overleven niet boven de 60 °C.

[2] Biomassawerven zijn bedrijven waar biomassastromen zoals bermmaaisel, snoeihout, blad, land- en tuinbouwafval en B- en C-hout, worden verzameld en verwerkt tot eindproducten zoals houtsnippers en compost. GFT wordt door deze bedrijven niet verwerkt.

Per afvalhoop zijn monsters genomen en zijn de karakteristieken vastgelegd, zoals ligduur, soort en structuur van het materiaal. Ook zijn foto's gemaakt en is de temperatuur in de afvalhoop gemeten, in graden Celsius (°C).
Bij de biomassabedrijven en (co-)vergisters zijn zowel het uitgangsmateriaal als het uiteindelijke product (compost en digestaat) bemonsterd. Van het composterend materiaal zijn monsters genomen van de verschillende stadia. In totaal zijn bij 28 locaties op 42 plekken 108 monsters verzameld. De monsters zijn geanalyseerd op azolen en op het voorkomen van (resistente en niet-resistente) ***A. fumigatus***. Alle data zijn verwerkt en geïnterpreteerd. Aansluitend zijn de resultaten besproken met experts van het Radboud Universitair Medisch Centrum (Radboud-UMC, het Rijksinstituut voor Milieuhygiëne (RIVM) en Wageningen University and Research (WUR), om maatregelen te formuleren om het ontstaan van hotspots te vermijden. De resultaten en mogelijke maatregelen zijn besproken in overleggen met de groencomposteer-, vergistings- en afvalhoutsector.

Resultaten

Hoeveelheden gevonden resistente en niet-resistente Aspergillus fumigatus worden uitgedrukt in, Colony Forming Units per gram materiaal (CFU/g). Een hoeveelheid resistente A. fumigatus > 1000 CFU/g, wordt gezien als hoog en betekent dat veel resistente schimmel aanwezig is. Welke aantallen een risico vormen voor verspreiding, die leidt tot blootstelling en gezondheidsrisico's voor de mens, is nog niet aan te geven; aangezien hierbij ook andere factoren een rol spelen. Onderzoek hiernaar is gaande.

Houtafval
Dit is bemonsterd op gemeentewerven, energiecentrales en biomassawerven.
Op gemeentewerven bevat het B-houtafval geen ***A. fumigatus*** en geen azolen. Het C-houtafval bevat wel azolen en soms lage gehaltes ***A. fumigatus***, maar geen resistente ***A. fumigatus***. Zowel B-, als C-houtafval op gemeentewerven is grof hout zonder rafels. Deze textuur verklaart dat hierin niet of nauwelijks ***A. fumigatus*** wordt gevonden.

Het B-houtafval bij de energiecentrales bevat in vier monsters wel A***. fumigatus***, in lage gehalten, maar geen resistente. De monsters zijn semi-grof en een mix van grove en fijnere stukken. In één monster bij een energiecentrale is een hoog gehalte resistente ***A. fumigatus*** aangetroffen. Dit monster bestaat uit fijngemalen bouw- en sloopafval, snoeihout en 1% GFT-afval; het monster bevat ook azolen.

B- en C-houtafval[3] op de biomassawerven bevat ***Aspergillus fumigatus***, waarbij in de helft van de monsters resistentie is aangetroffen. Dit hout bevat in bijna alle gevallen ook azolen. De monsters zonder resistentie betreffen grof materiaal. De monsters met resistente A***. fumigatus*** betreffen fijn of semi-grof materiaal.

In totaal is in het B-afvalhout sprake van hoge resistentie in 13% van de monsters (biomassawerven en energiecentrale) en in het C-hout in 8% van de monsters. De azolen die zijn aangetroffen zijn met name propiconazool en tebuconazool. Beide zijn toegelaten in Nederland voor het behandelen

[3] B-hout is geverfd hout of plaatmateriaal. Dit hout kan verontreinigd zijn met stoffen (zoals azolen) die aan de verf zijn toegevoegd om schimmelgroei te remmen. In het B-hout in deze studie zijn in bijna alle monsters azolen aangetroffen. C-hout is geïmpregneerd hout. Dit hout is behandeld met stoffen die schimmelgroei remmen.

van hout. Het houtafval is heterogeen in zowel samenstelling als formaat (planken, grove stukken en snippers). De temperatuur is ongeveer hetzelfde als de buitentemperatuur en wordt in de monsterperiode geschat op 25 °C. De ligduur varieert van 0 tot 912 dagen. Er is geen relatie vastgesteld tussen ligduur en het voorkomen van resistente ***A. fumigatus***. Resistentie treedt alleen op bij fijn tot semi-grof materiaal. De fijnheid van het materiaal lijkt dan ook de bepalende factor te zijn. Fijn tot semi-grof materiaal biedt ***A. fumigatus*** hoogstwaarschijnlijk betere omstandigheden om zich te ontwikkelen, door de aanwezigheid van een groter oppervlak, met condities waarop de schimmel zich kan ontwikkelen.

Groenafval, GFT afval en (co-)vergisting

Groenafval in kleine opslaghopen is divers, en betreft bijvoorbeeld sloot- en bermmaaisel, groenafval en houtsnippers, of een mengsel van deze stromen.

In slootmaaisel zijn geen azolen aangetroffen, meestal lage gehalten ***A. fumigatus*** en niet of nauwelijks resistente A***. fumigatus***. De temperatuur in de hopen varieert tussen 20 en 28 °C. De omstandigheden in een hoop riet (relatief houtig) en slootmaaisel (met bagger) maken dat groeicondities voor ***A. fumigatus*** minder gunstig zijn.

Bermmaaisel op een hoop, bevat enige ***A. fumigatus*** en lage aantallen resistente *A.* ***fumigatus***. Alleen in de monsters bermmaaisel uit een fruitteeltgebied, zijn azolen gedetecteerd (mogelijk door drift vanuit fruitpercelen) De temperatuur in de hopen varieerde tussen 25 en 60 °C.

In drie hopen met een combinatie van groenafval komen zeer hoge aantallen (resistente) ***Aspergillus fumigatus*** voor, maar geen azolen boven de detectiegrens. De temperatuur in deze hopen varieerde tussen 31 en 65 °C. De omstandigheden in deze hopen zijn gunstig voor A***. fumigatus.*** Vanwege de heterogene samenstelling (inclusief land- en tuinbouwafval) is het mogelijk dat in de hopen plaatselijk wel detecteerbare azolen voorkomen en dat de resistente ***A. fumigatus*** zich heeft verspreid door de hoop, of dat resistente sporen van ***A. fumigatus*** van elders zijn ingewaaid.

Groenafval op gemeentewerven bevat geen azolen en in twee van de drie hopen resistente ***A. fumigatus*** in relatief lage gehalten. De temperatuur varieert tussen 18 en 47 °C.

Bij het **groenafval op biomassawerven** zijn alle aanwezige inputstromen en het composterend materiaal bemonsterd. In 63% van de genomen monsters was sprake van hoge resistentie
De inputstromen (het groenafval zelf) blijken altijd ***Aspergillus fumigatus*** in hoge aantallen te bevatten, ook de resistente variant. Soms worden azolen aangetroffen. Zodra de formele compostering enkele weken aan de gang is, dalen de gehalten (resistente) ***A. fumigatus*** zeer sterk. Na enkele weken zijn de gehalten resistente ***A. fumigatus*** laag, in vergelijking met het uitgangsmateriaal. In het eindproduct is niet of nauwelijks resistente ***A. fumigatus*** aanwezig.
Het groenafval (de 'inputstromen') is divers. Er is sprake van een mix van takken, bomen, blad en gras. Door deze diversiteit is het lastig een representatieve bemonstering te doen, om het gehalte aan azolen te bepalen. In een beperkt aantal gevallen zijn azolen gevonden in het groenafval, met als mogelijke oorzaken:

- de combinatie van lage concentraties, onder de detectielimiet.
- De heterogeniteit van het materiaal, waardoor op de ene plek wel azolen aanwezig zijn en op de andere niet.
- Sporen van resistente ***A. fumigatus*** zijn van elders, via de lucht, in het groenafval terecht gekomen en hebben zich daar vermeerderd.

Groenafval dat klaarligt voor co-vergisting bevatte alleen resistente **Aspergillus fumigatus** in het geval van bollenafval en enigszins vochtige en fijngemaakte graanresten, die naast het bollenafval lagen. Dit bollenafval bevat ook azolen. Na de co-vergisting is in het digestaat geen ***A. fumigatus*** meer aanwezig.

Het GFT-afval bestemd voor vergisting bevatte een beperkt aantal resistente ***A. fumigatus*.** Na vergisting is geen resistentie meer aanwezig.

Het vergiste supermarktafval bevat geen ***A. fumigatus***. Zowel het GFT-afval en het vergist materiaal bevatte sporen van azolen, afkomstig van azolengebruik in de groente- en fruitteelt.

Reflectie op de resultaten

Sleutelfactoren voor ontwikkeling en aantreffen van resistente ***Aspergillus fumigatus*** zijn organisch materiaal, vocht, zuurstof, temperatuur, samenstelling van het materiaal, ligduur en azolen.
Uit de schimmelmetingen blijkt in bijna 75% van de monsters van organisch materiaal ***Aspergillus fumigatus*** voor te komen. In 45% van de monsters is sprake van resistentie. Alle monsters bevatten visueel voldoende vocht en zuurstof, met uitzondering van het digestaat (zuurstofloos). De temperatuur varieerde tussen 11 en 65 °C. De schimmel kan groeien in deze brede range. Asexuele sporen overleven niet boven de 60 °C, maar tussen de 60 en 70 °C is de overleving afhankelijk van de tijdsduur van de blootstelling aan deze temperatuur. Een minimum temperatuur -waarbij de schimmel niet groeit- lijkt niet aan de orde.

Samenstelling van het materiaal
Dit lijkt met name bij hout van invloed op het aantreffen van resistentie. Resistente ***A. fumigatus*** wordt alleen aangetroffen in opslaghopen met fijne en semi-grove samenstelling van het houtafval. Door hout voor opslag niet te versnipperen, of na versnipperen snel te verwerken, ontwikkelt zich niet of nauwelijks ***A. fumigatus*** in het houtafval. Dit lijkt een effectieve methode, waarbij de uitdaging is om dit in de praktijk uit te voeren. Bij groenafval lijkt de samenstelling niet van invloed. Het vermijden van land- en tuinbouwafval bij de groenafvalcompostering is geen oplossing om resistentie-ontwikkeling te vermijden.

Ligduur
Een langere ligduur (>14 dagen) betekende bij bollenafval grote aantallen resistente ***A. fumigatus***. De ligduur in de huidige studie varieerde van minder dan een dag tot meer dan 2 jaar. In 20% van de monsters waar veel resistentie werd aangetroffen is de ligduur korter dan 14 dagen. Ligduur is echter lastig vast te stellen, omdat van tussenopslag sprake geweest kan zijn. Verwerking binnen 14 dagen kan de sterke ontwikkeling van resistentie verminderen; maar getoetst moet worden of deze verwerkingstijd voldoende effectief is. Organisch materiaal komt pieksgewijs vrij, zodat opslag op biomassawerven, voorafgaand aan compostering, noodzakelijk is.

Aanwezigheid van azolen
Dit is ook een sleutelfactor. Azolen induceren resistentie en ook bij zeer lage concentraties azolen komt resistentie-ontwikkeling voor. In alle houtmonsters met resistentie zijn ook azolen aangetroffen. In een deel van de groenafvalmonsters met resistente ***A. fumigatus*** zijn echter geen azolen aangetroffen. Deze bevinding wijkt af van eerdere studies, waarin wel altijd azolen werden aangetroffen, meestal in lage concentraties. Mogelijke verklaringen voor deze bevinding zijn:
- De concentratie van azolen ligt onder de detectielimiet.

- Het bemonsterde materiaal is zeer heterogeen, waardoor op de ene plek in de hoop wel azolen aanwezig zijn en op de andere niet.
- Resistentie is al eerder ontstaan bijvoorbeeld in een tussenopslag waar wel azolen aanwezig waren.
- Sporen van resistente ***A. fumigatus*** zijn ingewaaid.

Bewaarhopen en omzetten
De ontwikkeling van resistente ***A. fumigatus*** vindt met name plaats in bewaarhopen. Door regelmatige omzetting tijdens het composteringsproces wordt alle materiaal voldoende heet en nemen de aantallen (resistente) ***A. fumigatus*** af. Tijdens het omzetten komen veel sporen vrij. Er zijn echter geen luchtmetingen naar resistente ***A. fumigatus*** bij hotspots bekend.
Bij bollenafval zijn inmiddels voorwaarden gesteld aan de bewaring. Sinds begin 2021 geldt een wettelijk vastgelegd protocol over het omgaan met bollenafval van bedrijven, die azolen toepassen in de teelt.

Compost en kringloop
Het verwerken van groenafval en land- en tuinbouwafval tot compost is een belangrijk proces dat bijdraagt aan het benutten van reststoffen. Compost wordt toegepast als bodemverbeteraar en is van belang voor het op peil houden of brengen van het organisch stofgehalte in de bodem. Gebruik van compost past tevens naadloos in de door de overheid gestimuleerde kringlooplandbouw. Om compostering van groenafval te blijven benutten ligt het voor de hand maatregelen te nemen om de ontwikkeling van hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** in groenafvalhopen te voorkomen.

Conclusies en advisering

Conclusies
Houtafval bevat in een beperkt aantal gevallen hoge aantallen resistente ***A. fumigatus***. In B-hout is sprake van zeer hoge aantallen resistentie (van 8.500 tot 155.000 CFU/g) in 13% van de monsters (biomassawerven en energiecentrale), in het C-hout in 8% van de monsters (biomassawerf 87.500 CFU/g). Deze monsters bevatten ook azolen (met name propiconazool en tebuconazool); 75% van de houtmonsters bevatten deze azolen. Resistente ***A. fumigatus*** is alleen aangetroffen in hout dat is versnipperd tot semi-grof of fijn materiaal. Het versnipperen en op een hoop bewaren van B- en C-houtafval dat azolen bevat, vormt een risico voor de ontwikkeling van resistente ***A. fumigatus.***

In kleine opslaghopen met groenafval is sprake van hoge resistentie (>1000 CFU/g) in 30% van de monsters. Groenafval in de kleine opslaghopen, met sloot- of bermmaaisel, bevat niet of nauwelijks resistentie. In drie van de kleine afvalhopen (met schoffelafval en met een mix van gras, stro en riet) is sprake van zeer hoge aantallen resistente ***Aspergillus fumigatus*** (10.000 – 600.000 CFU/g). Opvallend is dat in alle drie van deze hopen sprake is van grote diversiteit aan materiaal. Er zijn in deze hopen geen azolen gedetecteerd. Dit kan te maken hebben met de combinatie van lage concentraties - onder de detectielimiet - en heterogeniteit van het materiaal, waardoor op de ene plek wel azolen aanwezig zijn en op de andere niet. Ook kunnen sporen van resistente ***A. fumigatus*** via de lucht van elders zijn aangevoerd. De heterogeniteit van de kleine groenafval-hopen maakt het nog niet mogelijk om duidelijkheid te verstrekken over het (moment van) optreden van de resistentie-ontwikkeling in deze hopen.

Het opslaan van groenafval op gemeentewerven leidt een enkele keer tot de ontwikkeling van resistente ***A. fumigatus***, met gehalten van maximaal 2.500 CFU/g. Azolen zijn in dit afval niet aangetroffen.

Het groenafval dat is opgeslagen op biomassawerven (alle ingangsstromen) bevat zeer hoge aantallen resistente ***A. fumigatus***, variërend van 22.500 tot 7 miljoen CFU/g. Gedurende het composteringsproces verminderen de resistente aantallen (variërend van 3.000 tot 19.000 CFU/g) en in het eindproduct (compost) zijn de aantallen nagenoeg nul (variërend van 0 tot 600 CFU/g). Azolen zijn slechts beperkt aangetroffen. Evenals in eerdere studies blijken verschillende deelstromen (takken, maaisel en bollenafval) elk hoge aantallen resistentie te bevatten.
Land- en tuinbouwafval en GFT-afval dat bij vergisters klaarligt voor vergisting bevat alleen in het geval van bollenafval zeer hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** (19.500 CFU/g). In enigszins vochtige en fijngemaakte graanresten dat naast bollenafval lag (1.200 CFU/g) en tuinbouwafval (1.710 CFU/g) is sprake van hoge aantallen en in GFT-afval van lage aantallen (540 CFU/g). Na vergisting is in alle gevallen geen ***A. fumigatus*** meer aanwezig. Bollenafval, GFT-afval en vergist materiaal bevatten sporen van azolen. Deze azolen zijn afkomstig van gebruik in de bollen- en groente- en fruitteelt.

Aanbevelingen

1. Advies aan de houtverwerkingssector is azoolhoudend B- en C-hout na versnipperen niet op te slaan maar zo snel mogelijk te verwerken, bijvoorbeeld in de verbrandingsovens. Indien opslag noodzakelijk is, adviseren we de snippers af te dekken. Advies is ook de effectiviteit van deze maatregelen te monitoren.

2. Aanbeveling aan de groencomposteersector is om mogelijke preventieve maatregelen (bijvoorbeeld afdekken) aan te dragen en de effectiviteit via een meetprogramma te testen door materiaal- en luchtmetingen. Effectieve maatregelen kunnen dan aansluitend worden toegepast om uit voorzorg de ontwikkeling van hoge aantal resistente ***Aspergillus fumigatus*** in groenafvalhopen te voorkomen. Als onderdeel van het meetprogramma is het advies op meerdere biomassawerven in groenafvaldeelstromen te meten voor verder inzicht in de relatie tussen aard en herkomst van groenafvaldeelstromen en het aantreffen van resistente ***A. fumigatus***. Wij adviseren de sector om hiermee op korte termijn pro-actief aan de slag te gaan in samenwerking met relevante stakeholders.

3. Aanbeveling aan de (co)vergistingssector is om voorvergisting van het GFT-afval en (co-)vergisting van land- en tuinbouwafval binnen enkele dagen uit te voeren en geen langere bewaring toe te passen (daar waar dat het geval is). Daarmee is de ontwikkeling van hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** in deze keten te voorkomen. Ook kan door afdekken verspreiding van de sporen beperkt worden of via inkuilen (zuurstofloos maken van het materiaal) groei en ontwikkeling gestopt worden. Mits praktisch uitvoerbaar is inkuilen een effectieve maatregel.

4. Het advies aan sectoren die betrokken zijn bij de Kleine Kringloop voor lokale opslag en/of compostering is te testen of door snelle verwerking, afdekking of inkuilen de ontwikkeling van hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** in de kleine groenafvalhopen te voorkomen zijn. En aansluitend uit voorzorg effectieve maatregelen toe te passen.

5. We adviseren het ministerie van I & W en RWS om met de ketens van houtverwerking, compostering (inclusief de Kleine Kringloop) en vergisting, de aanbevolen maatregelen te bespreken en afspraken te maken over invoering en monitoring.

6. Het advies aan de ministeries van LNV en I&W is een aantal kleine, lokale afvalhopen die heterogeen zijn te laten bemonsteren om de oorzaak van de resistentie in dit type hopen te achterhalen. Tevens adviseren we de ministeries in het recent gestarte onderzoek naar

samenstelling en werking van bokashi ook metingen aan ***Aspergillus fumigatus*** en azolen te laten verrichten, ook na het toepassen van de bokashi op de bodem. Dat is een efficiënte manier om systematisch inzicht te krijgen of bij deze methode inderdaad geen ontwikkeling van resistentie optreedt.

7. Verder is de aanbeveling aan het ministerie van VWS bij hotspots luchtmetingen uit te laten voeren, om na te gaan in welke hoeveelheden resistente ***A. fumigatus*** -sporen vrijkomen en over welke afstand de sporen zich verspreiden. Het ligt voor de hand deze metingen uit te voeren bij de hotspots waar zeer hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** zijn aangetroffen.

8. Het advies is om van de monsters met resistente ***A. fumigatus*** uit deze studie de DNA-sequenties te analyseren, om te bepalen of de gevonden sequenties overeenkomen met de in patiënten aangetroffen resistentie; om te onderzoeken of de resistentiemechanismen overeenkomen. Gezien de koppeling met de humane gezondheid ligt het voor de hand dat het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) hierin het voortouw neemt.

9. Tenslotte is het advies om na gaan of een van de gespecialiseerde laboratoria, met aangepaste technieken, de detectielimiet van azolen kan verlagen. Wanneer dit mogelijk is kunnen monsters, waarin zeer hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** - maar geen azolen - zijn aangetroffen, opnieuw op azolen geanalyseerd worden.

Summary

Green and wood waste are probable sources of azole-resistant Aspergillus fumigatus. Part B: monitoring

Introduction

This report describes the monitoring study concerning azole resistance of the fungus ***Aspergillus fumigatus*** at a number of locations, where storage and processing of green waste and wood waste takes place. The design of the study and selection of locations were based on a literature review and interviews as described in part A of the study 'Green and wood waste as a source of azole-resistant Aspergillus fumigatus (CLM report nr. 1065).

Azoles are a group of fungicides (substances that combat fungi). They have a wide scope of permitted use: as plant protection products, as biocidal products for wood preservation and as medicines (including veterinary medicine). Aspergillus fumigatus is a fungus that grows on dead plant material. Resistance of ***A. fumigatus*** to azoles develops in so called 'hot spots'. These are locations where azoles are almost always present and which have beneficial conditions for ***A. fumigatus*** growth: presence of organic material, temperature between 12 and 60 degrees Celsius (°C)[4] and sufficient moisture and oxygen. ***A. fumigatus***, especially the Azole-resistant strain, poses a risk for patients with weakened immune systems, lung infections and COVID-19. Research into the DNA of resistant A. fumigatus has shown that the **spores of *A. fumigatus***, that infect patients, originate from the environment.

To help prevent development of this resistance, Part A recommends monitoring green waste, wood waste and other agricultural and horticultural waste. For green waste, the recommendation is to take samples from locations with and without agricultural green waste, and to take samples from biomass processing facilities and local storage sites for green waste. These recommendations were implemented as part of this monitoring study.

Method

Based on the recommendations, a plan was drawn up for sampling at locations, where the greatest risk of resistance from ***Aspergillus fumigatus*** is expected: the collection and processing chains for wood waste, green compost and for agricultural and horticultural waste, that is used in biogas production. Subsequently, site managers were asked for permission to take samples and process the resulting data. The sampling locations were selected throughout the Netherlands, in order to identify any regional differences.

---

[4] Optimal temperature for growth of *Aspergillus fumigatus* ranges between 30 en 35 °C. A. fumigatus can grow in a wide temperature range of 12-65 °C. Asexuel spores do not survive temperatures above 60 °C.

Samples were taken from individual waste piles, characteristics such as duration of storage, kind and texture of the material were recorded, photos were taken and the temperature in the waste piles was measured, in grades Celsius (°C).
Both the starting material and the final product (finished compost and digested effluent from biogas production) were sampled at the biomass processors and biogas production facilities. Samples were taken from the material at various stages of composting. In total, 108 samples were collected, from 42 sample locations, at 28 sites. The samples were analysed for the presence of azoles and ***A. fumigatus*** (including the azole-resistent strain). All the collected data were processed and interpreted, and the results were then discussed with experts from Radboud University Medical Centre, the Rijksinstituut voor Milieuhygiène (RIVM) and Wageningen University and Research (WUR), in order to formulate measures to avoid the creation of hotspots. The results and possible measures were discussed with representatives from the green composting, biogas and waste wood sectors.

Results

Levels of ***A. fumigatus*** are expressed in Colony Forming Units per gram of material (CFU/g). A high level of resistant A. fumigatus is defined as a measurement higher than 1000 CFU/g. However, it is not yet possible to indicate which levels pose a risk of spreading that leads to exposure and health risks for humans. Research for this aspect is ongoing.

Wood waste
This was sampled at municipal waste collection facilities, power plants and biomass processing facilities.

At municipal waste collection facilities, the type B wood waste did not contain ***Aspergillus fumigatus*** and no azoles were detected. The type C wood waste did contain azoles and sometimes low levels of A. fumigatus, but no resistant ***A. fumigatus*** was found. The type B and type C wood waste at municipal waste collection facilities consists of larger pieces of relatively intact wood. This explains why little to no A. fumigatus was found at these locations.

The type B wood waste at power plants did contain low levels of ***Aspergillus fumigatus*** in four samples, but no azole resistance was found. The samples consisted of a mix of larger and smaller pieces of wood. A high level of resistant ***A. fumigatus*** was found in one sample at a power plant. This sample, which contained azoles, consisted of finely ground construction and demolition waste, tree pruning material and 1% organic waste.

The type B and type C wood waste sampled at biomass processing facilities contained ***Aspergillus fumigatus***, with resistance found in half of the samples. In almost all cases this wood also contained azoles. The samples without resistant ***A. fumigatus*** were from coarser material. The samples with resistant A. fumigatus were from fine or semi-coarse material.

In total, high levels of resistance were found in 13% of the samples of type B wood waste (from biomass processing facilities and a power plant) and in 8% of the samples of type C wood waste. The detected azoles consisted mainly of propiconazole and tebuconazole. Both of these agents are authorised in the Netherlands for wood treatment. The wood waste was heterogeneous in both composition and format (a mixture of boards, coarse pieces and chips). The temperature was approximately at ambient level and was estimated at 25 degrees during the sampling period. The duration of storage ranged from 0 days to 912 days. No relationship was found between duration of storage and the occurrence of resistant ***A. fumigatus***. Resistance was found only in fine to semi-

coarse material. The texture of the material therefore seems to be the determining factor. Due to its larger surface area, fine to semi-coarse material most likely provides ***A. fumigatus*** with more beneficial conditions for development.

Green waste

Green waste in small storage piles is diverse and consists of components, such as plant waste from verge mowing and ditch maintenance, green waste and wood chips, or a mixture of these components.

In plant waste from ditch maintenance, we found no azoles, generally low levels of ***Aspergillus fumigatus*** and little or no resistant ***A. fumigatus***. The temperature in the storage piles ranged between 20 and 28 °C. The conditions in a mixed pile of reed cuttings (relatively woody) and plant waste from ditch maintenance (with sediment) were less favourable for growth of ***A. fumigatus***.

Plant waste from verge mowing that was stored in a pile contained some ***A. fumigatus*** and low levels of resistant ***A. fumigatus***. Azoles were detected only in the samples from a fruit growing area, possibly due to spray drift. The temperature in the piles ranged between 25 and 60 °C. These conditions are relatively beneficial for growth of ***A. fumigatus***.

Three piles with a combination of green waste contained very high levels of ***Aspergillus fumigatus*** – including the resistant strain – but no azoles were detected. The temperature in these piles ranged between 31and 65 °C. The conditions in these piles are beneficial for growth of ***A. fumigatus.*** Due to the heterogeneous composition (including agricultural and horticultural waste), it is possible that detectable azoles were still present in parts of the piles and that the resistant ***A. fumigatus*** had spread through the pile, or airborne spores of resistant ***A. fumigatus*** have blown in from elsewhere.

Green waste at municipal waste collection facilities did not contain azoles, and in two of the three piles resistant ***A. fumigatus*** was found at relatively low levels. The temperature ranged between 18 and 47 °C.

Green waste at biomass processing facilities: at the biomass processing facilities, all input streams and the material undergoing composting were sampled. All the green waste contained high levels of ***Aspergillus fumigatus***, also the resistant strain. Azoles were detected in some samples. After composting for a few weeks, the levels of ***A. fumigatus*** (also the resistant strain) fell very sharply. At that point, the levels of resistant ***A. fumigatus*** were low compared to the starting material. The final product (finished compost) contained little or no resistant ***A. fumigatus***.
Green waste is diverse in composition and consists of a mix of branches, trees, leaves and grass. This diversity makes it difficult to do representative sampling to determine azole levels. In a few cases, azoles have been found in green waste, due to several causes:

- the combination of concentrations, below the detection limit.
- Heterogeneity of the material; as a result, azoles may be present in one part of the pile and not in another.
- Airborne spores of resistant ***A. fumigatus*** from elsewhere ended up in the green waste and began to grow there.

Green waste for biogas production contained resistant ***A. fumigatus*** only in samples with flower bulb waste and grain residues. The flower bulb waste also contained azoles. After digestion in a biogas reactor, ***A. fumigatus*** was no longer present in either material.
The organic waste destined for biogas production contained low levels of resistant ***A. fumigatus***, but resistant ***A. fumigatus*** was no longer present in the effluent after digestion. After digestion of

supermarket waste, the effluent did not contain ***A. fumigatus***. Organic waste and the corresponding effluent material contained traces of azoles, probably originating from fruit and vegetable cultivation.

Reflection on the results

Key factors for the development and detection of resistant ***Aspergillus fumigatus*** are organic material, moisture, oxygen, temperature, material composition, duration of storage and presence of azoles.
The fungi tests showed that ***A. fumigatus*** was present almost 75% of the samples of organic material. Resistant strains of ***A. fumigatus*** were found in 45% of the samples. Based on visual examination, all samples contained sufficient moisture and oxygen, with the exception of the digested effluent from biogas production (oxygen-free). The temperature of the storage piles ranged between 11 and 65 °C. ***A. fumigatus*** can grow in a wide temperature range. Asexual spores do not survive above 60 °C but between 60 and 70 °C killing depends on time of exposure to these temperatures. A minimum temperature does not seem to be an issue.

The composition of the material
This appears to influence the occurrence of resistant strains, especially with wood waste. Resistant ***A. fumigatus*** was only found in storage piles with fine and semi-coarse wood waste. By not shredding wood for storage or by processing it quickly after shredding, little or no ***A. fumigatus*** develops in the wood waste. This appears to be an effective method; the challenge is to implement this in practice. The composition of green waste does not appear to influence ***A. fumigatus*** development. Avoiding agricultural and horticultural waste in green waste composting is not a solution to prevent resistance development.

Duration of storage
A longer duration of storage (> 14 days) resulted in high levels of resistant ***A. fumigatus*** in flower bulb waste. The duration of storage in the current study ranged from less than one day to more than 2 years. The duration of storage was less than 14 days in 20% of the samples in which high levels of resistance were found. Duration of storage is sometimes difficult to determine, however, because there may have been intermediate storage. Processing within 14 days can slow the development of resistance, but it must be determined whether this approach is sufficiently effective. However, organic material becomes available at peak times, so storage at biomass processing facilities prior to composting is necessary.

Presence of azoles
This is also a key factor. Azoles were also found in all wood samples with azole-resistant strains of ***A. fumigatus***. However, no azoles were found in some of the green waste samples with resistant ***A. fumigatus***. This finding differs from previous studies in which azoles, usually in low concentrations, were always found samples with resistant ***A. fumigatus***. Possible explanations for this finding are the following:

- The concentration of azoles is below the detection limit.
- The sampled material is very heterogeneous so that azoles are present in one part in the pile and not in another.
- Resistance has already developed, for example during intermediate storage at a location where azoles were present.
- Airborne spores of resistant ***A. fumigatus*** could have blown in.

Storage and processing
The development of resistant ***A. fumigatus*** mainly takes place in storage piles. Degradation during composting decreases the levels ***of A. fumigatus*** (also resistant strains). Many spores are probably released during degradation. To our knowledge, no measurements have been made to detect airborne spores of resistant ***A. fumigatus*** near hotspots, but concentrations of resistant ***A. fumigatus*** spores have been detected in background air samples.
Conditions have now been established for storage of bulb waste. Since the beginning of 2021, a statutory protocol has been in force on dealing with flower bulb waste, from farms that use azoles in cultivation.

Compost and circular agriculture
Processing of green waste to produce compost contributes to utilization of this waste. Compost is used to improve agricultural soils and supports the level of organic matter in soil. Using compost fits well in the goal of the government to stimulate circular agriculture. To continu the use of green waste in producing compost it is obvious to take measures to prevent development of high numbers of resistant ***A. fumigatus*** in green waste piles.

Conclusions and recommendations

Conclusions
In a small number of cases, wood waste contained high levels of resistant ***A. fumigatus***. Very high levels of resistant ***A. fumigatus*** were detected in 13% of the samples of Type B wood waste from biomass processing facilities and a power plant (ranging from 8,500 to 155,000 CFU/g) and in 8% of the samples of type C wood waste from a biomass processing facility (87,500 CFU/g). These samples also contained azoles (especially propiconazole and tebuconazole). Overall, 75% of the wood samples contained these azoles. Resistant ***A. fumigatus*** was found only in wood waste that had been shredded into semi-coarse or fine material. Shredding and bulk storage of type B and type C wood waste containing azoles poses a risk for the development of resistant ***A. fumigatus***.

In small storage piles with green waste, high levels of resistant ***Aspergillus fumigatus*** (> 1000 CFU/g) were found in 30% of the samples. Little or no resistant ***A. fumigatus*** was found in small storage piles of green waste from verge mowing and ditch maintenance. In three of the small waste piles (with hoeing waste and with a mix of grass, straw and reeds) very high levels of resistant ***A. fumigatus*** have been detected (10,000 to 600,000 CFU/g). The great diversity of the material in all three of these piles was striking. No azoles were detected in these piles. This may be due to the combination of concentrations below the detection limit and the heterogeneity of the material. As a result, azoles could be detected in one sample and not in another. Airborne spores of resistant ***A. fumigatus*** may also have been blown in from elsewhere. The heterogeneity of the small green waste piles makes it difficult to specify when resistance development in these piles can occur.

Storing green waste at municipal waste collection facilities occasionally leads to the development of resistant ***Aspergillus fumigatus***; levels of up to 2,550 CFU/g have been found.

The green waste stored at biomass processing facilities contains very high levels of resistant ***Aspergillus fumigatus***, ranging from 22,500 CFU/g to 7 million CFU/g. During composting the levels of resistant fungi decrease (ranging from 3,000 CFU/g to 19,000 CFU/g) and in the final product (finished compost) the levels are very low (ranging from 0 CFU/g to 600 CFU/g). As in previous studies separate green waste (branches, clippings and bulb waste) each show high levels of resistance.

In agricultural and horticultural waste for biogas production, very high levels of resistant ***A. fumigatus*** were found only in flower bulb waste (19,500 CFU/g). High levels of resistant ***A. fumigatus*** were found in grain residues (1,200 CFU/g) and horticultural waste (1,710 CFU/g); low levels were found in organic waste (540 CFU/g). In all cases, no ***A. fumigatus*** was present in the effluent after biogas production. Flower bulb waste, organic waste and the corresponding biogas effluent contained traces of azoles, which originated from the azoles used in the cultivation of flower bulbs, vegetables and fruit.

Recommendations

1. Do not store azole contaminated B and C wood waste after shredding, but have it incinerated as soon as possible. The effectiveness of this measure should be tested.

2. The recommendation for the compost sector is to test precautionary measures that prevent the development of high levels of resistant ***A. fumigatus*** in green waste piles using monitoring in both waste and air, and then implement these measures. As part of this monitoring program the biomass processing facilities can gain insight in the relation between the origin of separate green waste and the presence of resistant ***A. fumigatus***. We recommend to monitor and implement measures as soon as possible in cooperation with relevant stakeholders.

3. The recommendation for the biogas sector is to ensure that organic waste and agricultural and horticultural waste is co-digested within a few days (which is usually the case now) and is not stored for any longer than this. This prevents the development of high levels of resistant ***A. fumigatus*** in this chain. Spreading of spores can be limited by covering the material or by storing the material under anoxic conditions to prevent growth and development. This is effective if practically feasible.

4. In conjunction with the sectors involved in the Exemption Scheme for Plant Material (local storage and/or composting by water boards or farms), we also recommend to test whether measures like processing within a week or (anoxic) cover of the material are adequate to prevent development of high levels of resistant ***A. fumigatus***. And to apply the effective measures out of precaution.

5. It's recommended to the ministry of I & W and RWS to discuss the measures with the sectors involved in wood processing, compost and (co-) digesting and to make appointments on uptake and monitoring of the measures.

6. A recommendation to the ministries of LNV and I &W is to support sampling of a number of small, local waste piles that are heterogeneous in order to determine the cause of resistance development in this environment. And to support measurements on ***A. fumigatus*** and azoles in a recently started study in bokashi.

7. An additional recommendation to the ministry of VWS is to conduct air measurements at hotspots to determine the levels of resistant ***A. fumigatus*** spores that are released and become airborne. It makes sense to perform these measurements at hotspots where very high levels of resistant *Aspergillus* have been found.

8. The recommendation is to analyse the DNA sequences of the samples with resistant *Aspergillus* from this study to determine whether these sequences correspond to those found in patients with resistant ***A. fumigatus*** infections.

9. The final recommendation is to determine whether one of the specialised laboratories can lower the detection limit for azoles by using adapted techniques. If this becomes possible, then samples with very high levels of resistant ***A. fumigatus*** but no detectable azoles can be re-analysed for the presence of azoles.

1

Inleiding

In deel A van het onderzoek Groen- en houtafval als bron van azolen-resistente schimmel, is een literatuuronderzoek uitgevoerd en zijn interviews gehouden met stakeholders, om inzicht te verwerven in mogelijke "hotspots": plaatsen waar zowel azolen aanwezig zijn, als goede groeiomstandigheden voor het ontstaan van resistente ***Aspergillus fumigatus***, in groen- en houtafval (Leendertse et al. 2021a).

Azolen zijn een groep schimmelbestrijdingsmiddelen en kennen een breed toepassingsgebied: als gewasbeschermingsmiddel, biocide voor houtverduurzaming en (dier)geneesmiddel. ***Aspergillus fumigatus*** is een schimmel die groeit op dood plantmateriaal. Resistentie van ***A. fumigatus*** tegen azolen ontstaat in zogenaamde "hotspots:. Dit zijn plekken waar bijna altijd azolen aangetroffen worden (soms in zeer lage concentraties) en de omstandigheden voor ***A. fumigatus***-groei gunstig zijn, zodat deze de levenscyclus kan voltooien. De gunstige groei-omstandigheden zijn: organisch materiaal aanwezig, een temperatuur tussen 12 en 60 graden Celsius (°C)[5] en aanwezigheid van vocht en zuurstof (Van der Wal et al. 2014, Verweij et al. 2017, Schoustra et al. 2019a en b). (Resistente) ***A. fumigatus*** vormt een risico voor patiënten met een verzwakt immuunsysteem en longinfecties. Onbekend is hoe infectie met (resistente) sporen van ***A. fumigatus*** exact plaatsvindt. DNA-onderzoek van de resistente schimmel heeft echter aannemelijk gemaakt dat de sporen afkomstig zijn uit afvalhopen van organisch materiaal. Schoustra et al. 2019b geven aan dat de identieke resistentie-mutaties in het milieu (afvalhopen) en de patiënten wijzen op een rol van 'hotspots' bij infectie van patiënten.

In deel A is geschetst welke azolen en verwante bestrijdingsmiddelen zijn toegelaten in Nederland en voor welke toepassingen (Leendertse et al. 2021a). Op basis van eerder uitgevoerd onderzoek is in deel A beschreven waar "hotspots" verwacht kunnen worden. Voorts zijn de groen- en houtafvalketen beschreven, uitgaande van literatuur en de uitgevoerde interviews. Aan de hand van literatuur, interviews en het eerder uitgevoerde onderzoek is een monitoringsadvies opgesteld.
In dit monitoringsadvies wordt aanbevolen om zowel groen-, hout- als overig land- en tuinbouw-afval te monitoren. In eerder onderzoek is in groenafval resistente ***A. fumigatus*** gevonden, hoewel op het uitgangsmateriaal zelf meestal geen azolen gebruikt worden. Ook voor houtafval (categorie B- en C-hout) geldt dat hierin resistente ***A. fumigatus*** is aangetroffen in vorig onderzoek. In C-hout worden over het algemeen wel azolen gebruikt, in B-hout is dat soms het geval.
In de land- en tuinbouw worden azolen breed als schimmelbestrijders ingezet en daarom is ervoor gekozen ook daar bepaalde afvalstromen te bemonsteren (zie deel C, Leendertse et al. 2021c).

---

[5] Optimale temperatuur voor Aspergillus fumigatus ligt tussen 30 en 35 °C. De schimmel kan groeien in een brede temperatuurrange van 12-65 °C. Asexuele sporen overleven niet boven de 60 °C.

Voor het groenafval is geadviseerd om monsters te nemen mét en zonder agrarisch groenafval en om zowel bij biomassawerven te bemonsteren als in lokale groenafvalhopen.
Wat betreft het B- en C-hout is ook hier de aanbeveling om zowel op biomassawerven als op lokale afvalhoutopslagplekken monsters te nemen.
In dit rapport (deel B), worden de monitoring en resultaten beschreven, die zijn uitgevoerd op basis van het eerdere advies. Locaties zijn geselecteerd en locatie-eigenaren zijn gevraagd om medewerking te verlenen. Op de locaties zijn vervolgens monsters genomen en aansluitend zijn deze geanalyseerd op azolen en op (resistente) ***Aspergillus fumigatus***.

2

Werkwijze

2.1
Meetprogramma en werving bemonsteringslocaties

Op basis van deel A (Leendertse et al. 2021a) is de verwachting dat resistente ***A. fumigatus*** ontstaat in bewaarhopen met groen- en houtafval waar - mogelijk in zeer lage concentraties - azolen aanwezig zijn en waar de omstandigheden voor ***A. fumigatus*** -groei gunstig zijn: organisch materiaal aanwezig, een temperatuur tussen 12 en 60 °C en aanwezigheid van vocht en zuurstof. Aan de hand van deze informatie is een meetprogramma opgesteld, voor locaties waar gerede kans is op het ontstaan van resistentie bij ***A. Fumigatus***.
Tabel 2.1 geeft een overzicht van dit programma. De focus is gelegd op relevante meetlocaties in de drie ketens: van houtafval, groenafval en co-vergisting van land- en tuinbouwafval.

Tabel 2.1 Meetprogramma

Soort afval	Locatie	Kenmerk	Details bemonstering	Plekken (#)	Monsters (#)
Groenafval	Gemeentewerf	Zonder land- en tuinbouwafval	Afvalhoop	4	8
Groenafval	Kleine opslag	Zonder land- en tuinbouwafval	Afvalhoop	10	18
Groenafval	Kleine opslag	Met land- en tuinbouwafval	Afvalhoop	2	4
	Kleine opslag	Bokashi	Uitgereden materiaal	1	1
Groenafval	Biomassawerf	Met land- en tuinbouwafval	Groenafval/compost	1	2
Groenafval	Biomassawerf	Zonder land- en tuinbouwafval	Groenafval/compost	4	17
Houtafval	Gemeentewerf	B-hout	Afvalhoop	3	6
Houtafval	Gemeentewerf	C-hout	Afvalhoop	3	6
Houtafval	Energiecentrale	B-hout	Afvalhoop	3	7
Houtafval	Biomassawerf	B-hout	Afvalhoop	5	10
Houtafval	Biomassawerf	C-hout	Afvalhoop	3	6
Land- en tuin-bouwafval					
Vergisting	Energiecentrale	Met land- en tuinbouwafval	Tuinbouwafval/digestaat	1	5
Vergisting	Vergistingslocatie	Met land- en tuinbouwafval	Tuinbouwafval/digestaat	3	14
Vergisting	Locatie afvalverwerker	Met land- en tuinbouwafval	Tuinbouwafval/digestaat	1	4

2.1.1
Meetprogramma groenafval

Voor **groenafval** is gezocht naar locaties bij inzamelaars (gemeenten) en verwerkers (biomassawerven en vergisters). Tijdelijke opslagplekken zijn gevonden bij gemeenten, waterschappen, boeren en groenaannemers. Het groenafval wordt hier verzameld in relatief kleine hopen en daarna afgevoerd naar biomasawerven voor compostering. Soms vindt ter plekke compostering plaats, in het kader van de zogenaamde kleine kringloop. Grote opslagplekken, waar het groenafval klaarligt om gecomposteerd te worden, zijn te vinden bij biomassawerven. Locaties zijn gezocht via de verschillende betrokken brancheorganisaties (Branche Vereniging Organische Reststoffen (BVOR), Brancheverenigingen Recycling, Breken en Sorteren (BRBS), sloopaannemers (Veras), Koninklijke Vereniging van Hoveniers en Groenvoorzieners (VHG), Vereniging Afvalbedrijven, Bureau Bijzondere Opdrachten (BBO) en de brancheverenigingen van loonwerkers (Cumela), waterschappen en gemeenten. Waar mogelijk is onderscheid gemaakt in groenafval met en zonder land- en tuinbouwafval. Dit is gedaan om te onderzoeken of groenafvalhopen zonder land- en tuinbouwafval geen azolen en resistente ***A. fumigatus*** bevatten. Mocht dit het geval zijn, dan zou het strikt gescheiden houden van groenafval mét en zonder land- en tuinbouwafval, een effectieve maatregel kunnen zijn om ontwikkeling van resistentie te voorkomen

2.1.2
Meetprogramma afvalhout

Wat betreft de **afvalhoutsector** is naar locaties gezocht bij inzamelaars (gemeenten, hoveniers en biomassawerven) en energiecentrales. Ook bij het vinden van deze locaties zijn de brancheorganisaties behulpzaam geweest. Het betreft gemeentelocaties, energiecentrales en biomassawerven.

2.1.3
Meetprogramma vergistingssector

Voor de **vergistingssector** is met name via de BBO gezocht naar locaties bij de (co-)vergisters om zowel uitgangsmateriaal als digestaat te bemonsteren.

De inhoud van het meetplan is afgestemd met het onderzoek van de Nederlandse Organisatie voor Wetenschappelijk Onderzoek (NWO), naar het voorkomen van resistentie door gebruik van azolen in de bloembollenteelt van Wageningen University and Research (WUR). CLM is in de klankbordgroep van dat onderzoek vertegenwoordigd en heeft korte lijnen met de onderzoekers van WUR.

Figuur 1. Globale ligging van de 28 monsterlocaties in Nederland.

2.2 Monstername

Op basis van het meetplan zijn monsters genomen in de groenafval- en houtafvalketen op de locaties zoals in 2.1 beschreven. Per afvalhoop zijn drie monsters genomen:

- 1A, standaardmonster (geanalyseerd)
- 1B, reservemonster (wordt bewaard, niet geanalyseerd)
- 2, monster van dezelfde plek, maar met andere samenstelling (geanalyseerd)

Op enkele homogene plekken is slechts één monster genomen.

De monsters zijn genomen op ca. 50 cm diepte op een plek die de gemiddelde samenstelling van de afvalhoop weerspiegelde. Voor de azolenanalyse is een representatief monster van ca. 2 l genomen en voor de ***Aspergillus***-analyse een representatief monster van ca. 50 ml. Binnen 6 uur zijn de genomen monsters respectievelijk gekoeld en ingevroren. De monsters zijn binnen 1 maand geanalyseerd.

Ook zijn foto's genomen, karakteristieken als ligduur genoteerd en is de temperatuur gemeten op circa 50 cm diepte, om de basiscondities te monitoren die gunstig zijn voor de ontwikkeling van ***A. fumigatus***. De monsters voor de azolenanalyse zijn diepgevroren bewaard bij -18 °C, voor de ***A. fumigatus*** -analyse zijn de monsters gekoeld opgeslagen bij 4 °C.

Bij de biomassabedrijven en (co-)vergisters zijn zowel het uitgangsmateriaal of inputstromen als het uiteindelijke product (compost en digestaat) bemonsterd. Van het composterend materiaal zijn monsters genomen van de verschillende stadia. In totaal is op 28 locaties bemonsterd. Dit betrof 44 monsterplekken, waar 108 monsters zijn genomen, die vervolgens zijn geanalyseerd, zie tabel 2.2.1 en 2.2.2 hieronder.

Tabel 2.2.1 Details bemonstering

Aantal locaties	28
Aantal monsterplekken	44
Aantal monsters	108

De verdeling van de monsters varieert van 8 (in groenafval bij gemeenten) tot 23 (bij kleine opslaghopen, (co-)vergisting en B-hout), zie tabel 2.2.2 hieronder

Tabel 2.2.2 Details monsterverdeling

Locatie	Aantal
Biomassawerven groenafval	19
Kleine opslag	23
Gemeentewerven groenafval	8
Vergisters	23
B-hout	23
C-hout	12
Totaal	108

2.3 Analyse monsters

De genomen monsters zijn in een daarvoor geschikt laboratorium op het voorkomen van (resistenties van) ***A. fumigatus*** en op aanwezigheid en concentraties van azolen getest, volgens de methoden zoals beschreven in Verweij et al. (2017) en Schoustra et al (2019a).

2.3.1 Azolen

De monsters bestemd voor analyse op azolen, zijn onderzocht door het gecertificeerde laboratorium Groen Agro Control. Groen Agro Control heeft hiervoor de GC-MS/MS-methode en de LC-MS/MS-methode toegepast. Er is geanalyseerd op alle azolen die zijn toegelaten als gewasbeschermingsmiddel: bromuconazook, cyproconazool, difeconazool, epoxiconazool, imazalil, metconazool, paclobutrazool, penconazool, prochloraz, prothioconazool, prothioconazool-desthio (metaboliet van prothioconazool), tebuconazool, trifumizool, triticonazool) en als biocide: propiconazool, tebuconazool, cyproconazool, imazalil.

2.3.2
(Resistente) Aspergillus fumigatus

De analyse van het voorkomen van (resistenties van) ***A. fumigatus*** is uitgevoerd door het Departement Plantenwetenschappen, Laboratorium voor Erfelijkheidsleer, van WUR; waarbij de volgende werkwijze is gehanteerd:

- Alle monsters, behalve hout, zijn voorbewerkt door 5,0 g monster toe te voegen aan 30 ml buffer (0,8% saline met 0,05% Tween-80). Houtmonsters zijn voorbewerkt door 2,0 g monster toe te voegen aan 5 ml buffer. Verdunningen van de verkregen oplossingen zijn gemaakt in 0,8% saline met 0,005% Tween-80.
- De aanwezigheid van ***Aspergillus fumigatus*** in de monsters is bepaald door 50 µl monster uit te platen op agarplaten. Aanwezigheid van resistente ***A. fumigatus*** is getest door monsters uit te platen op agarplaten in aanwezigheid van itraconazool (4 µg/ml) of tebuconazool (4 µg/ml).

De detectielimiet voor alle monsters, behalve hout, was 120 kolonies per gram. Voor houtmonsters was de detectielimiet 50 kolonies per gram. Bij toepassing van de wijze van voorbewerking van groenafvalmonsters op de houtmonsters werd vaak geen ***A. fumigatus*** aangetroffen. Daarom is voor een lagere detectielimiet gekozen, en als gevolg hiervan een andere voorbewerking van houtmonsters toegepast. De detectielimiet voor het groen- en het houtafval liggen echter wel in dezelfde orde van grootte. Door deze werkwijze zijn de resultaten nauwkeuriger geworden.

De resultaten van **A. fumigatus** tussen de monsters 1A en 2 (die in dezelfde afvalhoop zijn genomen, maar met visueel verschillend materiaal) zijn voor al deze monsters op een rij gezet. Bij de resultaten van de aanwezigheid van **A. fumigatus** is in 86% van de gevallen de uitslag eenduidig (Dat wil zeggen geen A. fumigatus, 50-1000 of > 1000 CFU/g). Voor de resistente **A. fumigatus** is dit 82%.

2.4
Dataverwerking en -analyse

Alle data zijn verwerkt in een resultatenoverzicht van het meetonderzoek. Van alle locaties en bemonsterde materialen zijn de metingen van temperatuur, azolen en (resistente) ***A. fumigatus*** in dit overzicht opgenomen. Aansluitend heeft interpretatie van de data plaatsgevonden.

2.5
Bespreking bevindingen en advisering effectieve maatregelen

Zowel de bevindingen uit de monitoring als mogelijke maatregelen om ontwikkeling van resistente ***Aspergillus fumigatus*** zoveel mogelijk te beperken zijn in een tweetal overleggen besproken. Eerst is overlegd met experts van Radboud UMC, RIVM en WUR. Zij hebben de analyse en interpretatie van de resultaten getoetst. Vervolgens zijn mogelijke maatregelen besproken om het ontstaan van hotspots in deze sectoren te vermijden. Inzichten uit eerdere onderzoeken naar ontwikkeling, aanwezigheid en verspreiding van resistente ***A. fumigatus*** **zijn** hierbij betrokken. Dit betreft zowel Nederlandse als buitenlandse studies als het lopende NWO-onderzoek.

Aansluitend zijn de bevindingen besproken met de groencomposteer-, afvalhout- en (co-) vergistingssector en met de ministeries van I&W, LNV en VWS. Daarbij is ook verkend welke effectieve maatregelen zijn te nemen en in hoeverre deze praktisch uitvoerbaar en handhaafbaar zijn.

3

Resultaten

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de analyses op azolen en ***Aspergillus fumigatus*** van de monsters beschreven. Azolen zijn weergegeven in milligram per gram. Hoeveelheden gevonden ***A. fumigatus*** worden uitgedrukt in CFU/g, Colony Forming Units per gram materiaal.

Wanneer de hoeveelheid resistente ***A. fumigatus*** > 1000 CFU/g ligt, betekent dit dat er veel resistente schimmel in de afvalhoop aanwezig is. Welke aantallen een risico vormen voor verspreiding die leidt tot blootstelling en gezondheidsrisico's voor de mens is nog niet aan te geven. Deze vraag wordt momenteel verder onderzocht, onder meer via onderzoek naar transmissie. Wel hebben Wageningen Universiteit en Radboud UMC door onderzoek van het DNA van de resistente ***A. fumigatus*** aannemelijk gemaakt dat de ***A. fumigatus*** -sporen die voor besmetting van patiënten zorgen, uit het milieu afkomstig zijn. Het is gebleken dat naast leukemiepatiënten ook patiënten met longinfecties of COVID19 gevoelig zijn voor ***A. fumigatus***.

De ligduur die vermeld wordt, is de ligduur op de betreffende locatie. De ligduur in eventuele vooropslag is niet bekend en in deze tijdsduur dus niet meegenomen. De weergegeven tijd betreft dus de minimale ligduur.

3.1 Houtafval

Het B-houtafval op de **gemeentewerven** (of milieustraten) bevat geen ***Aspergillus fumigatus*** en geen azolen (zie tabel 3.1 op de volgende pagina).
C-houtafval op gemeentewerven bevat soms lage gehaltes ***A. fumigatus***, maar geen resistente schimmels. Dit C-hout bevat wel azolen, namelijk propiconazool en tebuconazool (zie ook tabel 3.1 op de volgende pagina). Deze beide azolen worden toegepast bij de schimmelwerende behandeling van hout.

Figuur 2: Foto van categorie B-houtafval (grof), zonder Aspergillus, op een gemeentewerf

Zowel het B- als C-afval op de gemeentewerven bestaat uit grove stukken hout zonder rafels, zoals te zien is op de foto van figuur 2 hierboven. Dit type grove stukken is in tabel 3.1 ingedeeld in de

categorie 'Grof'. De stukken zijn dermate grof dat het goed verklaarbaar is dat hier geen of nauwelijks ***A. fumigatus*** wordt aangetroffen.

Het B-houtafval bij de **energiecentrales**[6] bevat in vier monsters wel ***Aspergillus fumigatus*** in lage gehalten, maar geen resistentie (tabel 3.1). De monsters zijn semi-grof en een mix van grove en fijnere stukken (figuur 3) en bevatten propiconazool en tebuzonazool.

Figuur 3: Foto van categorie B-houtafval (semi-grof), zonder resistente Aspergillus, bij een energiecentrale

Tabel 3.1 Kenmerken en locaties grof en semi-grof houtafval: ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg), (gemiddelde van 2 monsters, 1A en 2).

Locatie	Structuur	Ligduur (dagen)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
Gemeentewerf	Grof	3	0	0	0	0,00
Gemeentewerf	Grof	21	0	0	0	0,00
Gemeentewerf	Grof	30	0	0	0	0,00
Gemeentewerf	Grof	7	0	0	0	45,50
Gemeentewerf	Grof	21	180	0	0	0,59
Gemeentewerf	Grof	60	1.375	0	0	0,04
Energiecentrale	Semi-grof	14	1.300	0	0	0,04
Energiecentrale	Semi-grof	547	350	0	0	0,31
Energiecentrale	Semi-grof	912	400	0	0	0,00
Energiecentrale	Semi-grof	42	125	0	0	0,01
Biomassawerf	Grof	42	100	0	0	0,07
Biomassawerf	Grof	21	75	0	0	0,65
Biomassawerf	Semi-grof	60	2.075	0	0	0,00
Biomassawerf	Grof	21	0	0	0	0,89

B- en C-houtafval op de biomassawerven bevat ***Aspergillus fumigatus***, waarbij in de helft van de monsters resistentie is aangetroffen; geen resistente ***A. Fumigatus*** (zie tabel 3.1 hierboven), wel resistente ***A. Fumigatus*** (zie tabel 3.2 op pagina 26). Dit hout bevat in bijna alle gevallen ook beide azolen (propiconazool en tebuconazool). De monsters met resistente ***A. fumigatus*** betreffen fijn of semi-grof materiaal (figuur 4A op de volgende pagina). De monsters zonder resistentie betreffen grof materiaal (figuur 4B op de volgende pagina).

[6] In Nederland zijn geen energiecentrales die C-hout verwerken. C-hout wordt ter verbranding afgevoerd naar Duitsland.

Figuur 4 (A, rechts): Foto van semi-grof/fijn categorie B-houtafval, met resistente Aspergillus, op een biomassawerf
(B, links): Foto van grof categorie B-houtafval, zonder resistente Aspergillus, op een biomassawerf

In één monster bij een energiecentrale is een hoog gehalte ***A. fumigatus*** aangetroffen met een resistentiepercentage van 19% (zie tabel 3.2 op de volgende pagina). Dit monster bestaat uit fijngemalen bouw- en sloopafval, snoeihout en 1% GFT-afval (zie figuur 5 hieronder) en bevat naast propiconazool en tebuconazool ook azaconazool, prochloraz en imazalil. De eerste twee azolen worden zowel bij de houtbehandeling als bij de teelt van groente en fruit gebruikt. De andere drie worden alleen in (deels buitenlands geteelde) groene en fruit toegepast en zijn waarschijnlijk via de 1% GFT in de afvalhoop terecht gekomen.

Figuur 5: Foto van categorie B-houtafvalhoop, met resistente Aspergillus, binnen, bij een energiecentrale

Tabel 3.2 Kenmerken en locaties fijn en semi-grof houtafval: ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg), (gemiddelde van 2 monsters, 1A en 2)

Locatie	Structuur	Ligduur (dagen)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
Energiecentrale	Fijn	12	815.000	155.250	19	0,16
Biomassawerf	Fijn	14	283.440	8.430	3	0,47
Biomassawerf B	Semi-grof	14	2.150	413	19	0,28
Biomassawerf B	Semi-grof	21	4.750	613	13	0,31
Biomassawerf A	Semi-grof	21	260.425	87.538	34	0,20

In tabel 3.3 is het percentage monsters met een hoog gehalte resistente ***A. fumigatus*** samengevat (> 1000 CFU). In het B-hout is sprake van hoge resistentie in 13% van de monsters (biomassa-werven en energiecentrale), in het C-hout in 8% van de monsters.

Tabel 3.3 Aantal houtmonsters en percentage resistente Aspergillus fumigatus

Locatie	Aantal monsters	Resistentie (> 1000 CFU) (#)	Resistentie (> 1000 CFU) (%)
B-hout	23	3	13
C-hout	12	1	8

Het houtafval is heterogeen in zowel samenstelling als formaat. Soms is sprake van planken, soms van grove stukken gebroken hout en soms van snippers. De temperatuur is niet goed vast te stellen, maar is niet sterk verschillend van de buitentemperatuur en wordt in de monsterperiode geschat op 25 °C. De ligduur van het hout (grof en semi-grof) waar geen resistentie is gevonden, varieert van 0 tot 912 dagen. Resistentie treedt alleen op bij fijn tot semi-grof materiaal, in afvalhopen met een ligduur tussen 12 en 21 dagen. De fijnheid van het materiaal lijkt dan ook de bepalende factor te zijn. Fijn tot semi-grof materiaal biedt ***A. fumigatus*** hoogstwaarschijnlijk betere omstandigheden om zich te ontwikkelen, door de aanwezigheid van een groter oppervlak waarop de schimmel kan groeien.

3.2 Groenafval in kleine opslaghopen

Groenafval in kleine opslaghopen is divers. Om een beeld te krijgen van de diversiteit hebben we verschillende opslaghopen bemonsterd, zoals slootmaaisel, bermmaaisel, groenafval en houtsnippers in een berm. Een enkele keer is sprake van een combinatie van deze materialen.

3.2.1
Slootmaaisel

Slootmaaisel dat op de kant is gezet of op een hoop is geplaatst bevat meestal lage gehalten ***A. fumigatus*** en niet of nauwelijks resistente ***A. fumigatus*** (zie tabel 3.4). Ook zijn geen azolen gedetecteerd. De temperatuur in de hopen varieert tussen 20 en 28 °C. Figuur 6A geeft een beeld van slootmaaisel dat op de kant ligt; figuur 6B van slootmaaisel dat is verzameld en op een hoop is geplaatst. De ligduur van de hopen was -waar bekend- tussen 16 en 23 dagen. Of bij langere ligduur wel groei en resistentie op kan treden is niet bekend, maar wordt niet waarschijnlijk geacht.
De omstandigheden in een hoop riet (relatief houtig) en slootmaaisel (met bagger) maken dat groeicondities voor ***A. fumigatus*** minder gunstig zijn.

Tabel 3.4 Kenmerken slootafval (kleine opslaghopen): ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg) (gemiddelde van 2 monsters)

Type groenafval	Kenmerk	Ligduur (dagen)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
Slootmaaisel	Riet en ander plantmateriaal	16	0	0	0,0	0,00
Slootmaaisel	Riet en ander plantmateriaal	16	120	0	0,0	0,00
Slootmaaisel	Riet en ander plantmateriaal	23	840	0	0,0	0,00
Slootmaaisel	Slootmaaisel en groenafval	?	780	0	0,0	0,00
Berm- en sloot-maaisel	Berm-/sloot-maaisel	21	240	0	0,0	0,00
Rietmaaisel	Rietmaaisel en groenafval	?	540	30	5,6	0,00

Figuur 6: A (links): Kleine opslag, van op de kant gelegd slootmaaisel, zonder Aspergillus
B (rechts): Kleine opslaghoop van slootmaaisel, zonder Aspergillus

3.2.2
Bermmaaisel

Bermmaaisel dat op een hoop is geplaatst, bevat enige ***Aspergillus fumigatus*** en lage aantallen resistente ***A. fumigatus*** (tabel 3.5 hieronder). In deze monsters zijn alleen azolen gedetecteerd in het bermmaaisel uit een fruitteeltgebied. De azolen kunnen via drift (verwaaiing) in het bermgras terecht zijn gekomen. De temperatuur in de hopen varieerde tussen 25 en 60 °C. Deze maaisel-afvalhoop, met een verhoogd gehalte resistente ***A. fumigatus*** (1200 CFU/g) is weergegeven op foto 7A.
Foto 7A en B geven een beeld van de hopen maaisel. De groeicondities voor ***A. fumigatus*** zijn relatief gunstig.

Tabel 3.5 Kenmerken bermmaaisel (kleine opslaghopen): ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg) (groenafval en maaisel gemiddelde van 2 monsters 1A en 2)

Type groenafval	Kenmerk	Ligduur (dagen)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
Maaisel en groenafval	Onkruid en af-gedragen gewas	42	6.180	30	0,5	0,00
Maaisel	Hooi	16	4.800	1.200	25,0	0,00
Berm-maaisel	Uit fruitteelt-gebied	14	1.800	300	16,7	0,01

Figuur 7: A (links): Maaiselafvalhoop met beperkte aantallen resistente Aspergillus
B (rechts): Maaiselafvalhoop met onkruid, met Aspergillus

3.2.3
Combinatie van groenafval

In drie van de kleine afvalhopen met een combinatie van groenafval is sprake van zeer hoge aantallen (resistente) ***Aspergillus fumigatus*** (tabel 3.6 op de volgende pagina). Er zijn geen azolen

aangetroffen. Een van de afvalhopen bevat gras, stro en land- en tuinbouwafval en is bedoeld voor compostering (figuur 8 hiernaast).
De twee andere hopen bestaan uit divers groenafval (schoffel, snoei en maai-afval) (figuur 9A en B op de volgende pagina) en bevatten zeer hoge aantallen resistente ***A. fumigatus***. De temperatuur in deze hopen varieerde tussen 31 en 65 °C [7]. De omstandigheden in deze hopen zijn gunstig voor ***A. fumigatus***. Opvallend is dat in alle drie de gevallen sprake is van grote diversiteit van het materiaal. Er zijn geen azolen boven de detectiegrens aangetroffen. Vanwege de heterogene samenstelling (inclusief land- en tuinbouwafval), is het mogelijk dat plaatselijk in de hopen wel detecteerbare azolen voorkomen en/of dat de resistente ***A. fumigatus*** zich heeft verspreid door de hoop; of dat resistente sporen van ***A. fumigatus*** van elders zijn in ingewaaid en zich vervolgens hebben kunnen vermeerderen in het materiaal.

Figuur 8: Afvalhoop (compost) met gras, stro en land- en tuinbouwafval

Tabel 3.6 Kenmerken groenafval van kleine opslaghopen: ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg), (groenafval en maaisel gemiddelde van 2 monsters 1A en 2)

Type groenafval	Kenmerk	Ligduur (dagen)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
Groenafval en land- en tuin-bouwafval	Gras/stro/riet	14	447.000	9.930	2,2	0,00
Groenafval	80% schoffelafval, 20% snoeiafval	28	9.090.000	598.650	6,6	0,00
Groenafval	Snoei en maaiafval	7	9.661.560	606.030	6,3	0,00

3.2.4
Twee a-typische situaties

Tenslotte zijn nog twee atypische situaties bemonsterd. Deze situaties werden bij de bemonsteringsronde aangetroffen en vanwege mogelijke relevantie bemonsterd. Het betreft een hoop houtsnippers in een berm en over een perceel uitgereden Bokashi. In deze monsters zijn geen azolen aangetroffen. In de hoop houtsnippers zijn hoge aantallen ***A. fumigatus*** aangetroffen en lage

[7] De schimmel kan groeien in een brede temperatuurrange van 12-65 °C. Asexuele sporen overleven niet boven de 60 °C (Schoustra et al. 2019b). Tussen de 60 en 70 °C is de overleving afhankelijk van de tijdsduur van de blootstelling aan deze temperaturen (van der Wal et al. 2014)

aantallen resistentie. In de uitgereden Bokashi is ***A. fumigatus*** aangetroffen en ook enige resistentie (1560 CFU/g). In eerder onderzoek (Schoustra et al. 2019a) is in een Bokashi -hoop geen resistentie aangetroffen. Dat is logisch omdat het proces van Bokashi-vorming anaeroob is en ***A. fumigatus*** zuurstof nodig heeft voor ontwikkeling en groei. In de huidige bemonstering lag de Bokashi echter al 21 dagen op het veld, zodat ***A. fumigatus*** zich alsnog kan ontwikkelen (na herbesmetting).

Figuur 9A en B: Kleine afvalhopen met hoge aantallen resistente Aspergillus

Tabel 3.7 Kenmerken organisch materiaal: ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg) (houtsnippers en uitgereden Bokashimateriaal, waarden van 1 monster)

Type organisch materiaal	Locatie	Kenmerk	Ligduur (dagen)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
Houtsnippers	Kleine opslag	Houtsnippers van takken etc.	21	27.840	180	0,6	0,00
Bokashi materiaal	Perceel	Uitgereden over perceel	21	8.160	1.560	19,1	0,00

In tabel 3.8 is het percentage monsters met een hoog (>1000 CFU) gehalte resistente ***A. fumigatus*** weergegeven. In de kleine opslaghopen is sprake van hoge resistentie in 30% van de monsters.

Tabel 3. 8 Aantal monsters in kleine opslaghopen en percentage resistente Aspergillus fumigatus

Locatie	Aantal monsters	Resistentie (> 1000 CFU) (#)	Resistentie (> 1000 CFU) (%)
Kleine opslag	23	7	30

De kleine groenafvalhopen zijn divers zowel in samenstelling als formaat. In afvalhopen met sloot- en bermmaaisel is niet of nauwelijks sprake van resistente ***A. fumigatus***. In enkele afvalhopen met een mix van schoffelafval en met een mix van gras/stro/riet/mest zijn wel hoge gehalten aangetroffen. De temperatuur in de hopen varieerde tussen 25 en 65 °C, waarbij in hopen met hogere temperatuur (> 32 °C) duidelijk sprake was van broei. In de hopen zijn geen detecteerbare concentraties azolen aangetroffen.

3.3
Groenafval op gemeentewerven

Figuur 10A en B: Groenafvalhopen, grof materiaal, met resistente Aspergillus op gemeentewerf

Groenafval op gemeentewerven bevatte in twee van de vier afvalhopen resistente ***Aspergillus fumigatus*** in relatief lage gehalten (figuur 10A en B hierboven en tabel 3.9 op de volgende pagina). In de monsters zijn geen detecteerbare gehaltes azolen aangetroffen. De temperatuur in deze groenafvalhopen varieerde tussen 18 en 47 °C.
De andere groenafvalhopen op de gemeentewerven (figuur 11 hiernaast) bevatten geen resistente ***Aspergillus fumigatus***.

In tabel 3.10 (op de volgende pagina) is het percentage monsters met een verhoogd (> 1000 CFU) gehalte resistente ***A. fumigatus*** weergegeven. In groenafval op de gemeentewerven is dit het geval in 33% van de monsters.

Figuur 11: Groenafvalhoop zonder resistente Aspergillus

Tabel 3.9 Kenmerken groenafval op gemeentewerven: ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg), (gemiddelde van 2 monsters 1A en 2)

Type groenafval	Kenmerk	Ligduur (dagen)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
Groenafval	Gras (maaisel)	3	0	0	0,0	0,00
Groenafval	Tuin- en hoveniersafval	14	300	0	0,0	0,00
Groenafval	Takken, blad, gras	0,5	2.604.120	2.550	0,1	0,00
Groenafval	Blad, takken, maaisel	21	28.620	780	2,7	0,00

Tabel 3.10 Aantal monsters in groenafval op gemeentewerven en percentage resistente Aspergillus fumigatus

Locatie	Aantal monsters	Resistentie (> 1000 CFU) (#)	Resistentie (> 1000 CFU) (%)
Groenafval gemeentewerf	8	2	25

3.4 Groenafval op biomassawerven

Bij de biomassawerven zijn de aanwezige inputstromen zoveel mogelijk separaat bemonsterd. Bij biomassawerven A en C waren de inputstromen relatief homogeen (zie figuur 12 hieronder).

Figuur 12: A (links): Groenafvalhoop biomassawerf A, met resistente Aspergillus
B (midden): Groenafval (versnipperd) biomassawerf C, met resistente Aspergillus
C (rechts): Groenafval (maaisel) biomassawerf C, met resistente Aspergillus

Bij biomassawerf B was separaat bemonsteren niet uitvoerbaar, omdat sprake was van een mix van takken, bomen, blad en gras (zie figuur 113 hiernaast). Hier is alleen een mix van het groenafval en van het composterend materiaal, in verschillende stadia, bemonsterd.

Bij biomassawerf D -waar alleen tussenopslag plaatsvond en de uiteindelijke bestemming van het materiaal een andere biomassawerf was- waren de inputstromen fysiek gescheiden, zodat deze separaat bemonsterd konden worden. Het betrof bollenafval (figuur 14 hieronder, foto A), groenafval (versnipperd, 14B) en groenafval met vooral takken (14C).

Figuur 13: Groenafval (mix) Biomassawerf B, resistente Aspergillus

Figuur 14: A (links): Bollenafvalhoop, biomassawerf D, met resistente Aspergillus
B (midden): Hoop versnipperd groenafval, biomassawerf D, met resistente Aspergillus
C (rechts): Groenafvalhoop, biomassawerf D, met resistente Aspergillus

Het **groenafval** blijkt op alle vier de werven altijd ***Aspergillus fumigatus*** in hoge aantallen te bevatten. Ook de resistente variant (tabel 3.11). Op de drie locaties waar compostering plaatsvindt, zien we een sterke daling van de (resistente) ***A. fumigatus*** zodra de compostering enkele weken aan de gang is. In de monsters met een temperatuur van 62 en 65 °C is bijna geen resistente ***A. fumigatus*** aanwezig. Dit beeld is bekend van de eerdere onderzoeken bij biomassawerven (Van der Wal et al. 2014 en Verweij et al. 2017). Bij het monster met een temperatuur van 59 °C is nog wel ***A. fumigatus*** aanwezig en geen resistentie gevonden (tabel 3.11 op de volgende pagina).

De heterogeniteit van het groenafval op biomassawerven maakt het lastig een representatieve bemonstering te doen om azolen te bepalen. Lang niet in alle gevallen zijn in het groenafval azolen aangetroffen (tabel 3.11). Dit kan te maken hebben met een combinatie van lage concentraties die onder de detectielimiet liggen en de heterogeniteit van het materiaal, waardoor op de ene plek wel azolen aanwezig zijn en op de andere niet. Een mogelijke andere oorzaak is dat sporen van resistente ***A. fumigatus*** van elders, via de lucht, in het groenafval terecht zijn gekomen en zich daar hebben vermeerderd. In het bollenafval op biomassawerf D zijn azolen (difenoconazool en propiconazool) aangetroffen en resistente ***A. fumigatus***.

Tabel 3.11 Kenmerken groenafval en composterend materiaal op gemeentewerven: ligduur in dagen, temperatuur (°C), totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg), (Gemiddelde van 2 monsters 1A en 2 voor biomassawerf B en D, waarde van 1 monster voor biomassawerf A en C)

Type groenafval	Locatie	Kenmerk	Ligduur (dagen)	Temperatuur (°C)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
Groenafvalhoop	Biomassawerf A	Met name takken	14	53	39.600.000	7.320.000	18	0,00
Groenafvalhoop	Biomassawerf A	Met name takken	56	59	240.000	0	0	0,00
Compost (beginstadium)	Biomassawerf A	Composterend materiaal	14	34	8.400	3.000	36	0,00
Compost (tussenstadium	Biomassawerf A	Composterend materiaal	75	50	0	0	0	0,00
Compost (eindstadium)	Biomassawerf A	Compost	183	31	3.600	600	17	
								0,00
Groenafvalhoop	Biomassawerf B	Mix van takken	28	17	1.980.000	483.900	24	0,00
Compost (tussenstadium)	Biomassawerf B	Composterend materiaal	21	51	37.200	19.200	52	0,00
Compost (tussenstadium)	Biomassawerf B	Composterend materiaal	28	65	19.860	120	1	0,02
Groenafval (versnippert)	Biomassawerf C	Versnipperd snoeiafval	60	27	37.200	23.400	63	0,00
Maaisel	Biomassawerf C	Grasmaaisel	60	32	480.000	87.000	18	0,00
Composterend materiaal (beginstadium)	Biomassawerf C	Composterend materiaal	21	62	3.600	300	8	0,00
Compost (eindstadium)	Biomassawerf C	Compost	140	NA*	2.400	0	0	0,00
Bollenafval	Biomassawerf D	Tussenopslag	7	47	70.200	40.200	57	0,15
Groenafval	Biomassawerf D	Tussenopslag	21	23	3.480.000	990.000	28	0,01
Groenafval (vooral takken)	Biomassawerf D	Tussenopslag	91	11	252.600	22.500	9	0,00

*NA = niet geanalyseerd

Tijdens het formele composteringsproces dalen de gehalten (resistente) ***A. fumigatus*** zeer sterk. Na enkele weken zijn de gehalten resistente ***A. fumigatus*** laag (120-3000 CFU/g) in vergelijking met het uitgangsmateriaal (23400-3660000 CFU/g). In het eindproduct is na enkele maanden is niet of nauwelijks resistente ***A. fumigatus*** aangetroffen (0 – 600 CFU/g) (tabel 3.11 hierboven, figuur 15 op de volgende pagina).

In tabel 3.12 hieronder is het percentage monsters met een hoog (> 1000 CFU/g) gehalte resistente ***Aspergillus*** weergegeven. In groenafval op de biomassawerven is sprake van hoge resistentie in 63% van de monsters. Soms worden azolen aangetroffen. In het composteringsproces neemt het aantal resistente ***A. fumigatus*** sterk af.

Figuur 15: Compost als eindproduct op de biomassa-werf; niet of nauwelijks resistente Aspergillus, temperatuur gedaald naar 31 °C.

Tabel 3.12 Aantal monsters in groenafval op biomassawerven en percentage resistente Aspergillus fumigatus

Locatie	Aantal monsters	Resistentie (> 1000 CFU) (#)	Resistentie (> 1000 CFU) (%)
Groenafval biomassawerf	19	12	63

3.5
Land- en tuinbouwafval, GFT-afval en (co-)vergisting

Figuur 16: A (links): Bollenafvalhoop, voordat het co-vergister (A) ingaat
B (midden): Groentenafval, voordat het co-vergister (A) ingaat
C (rechts): Co-vergist materiaal (vergister A)

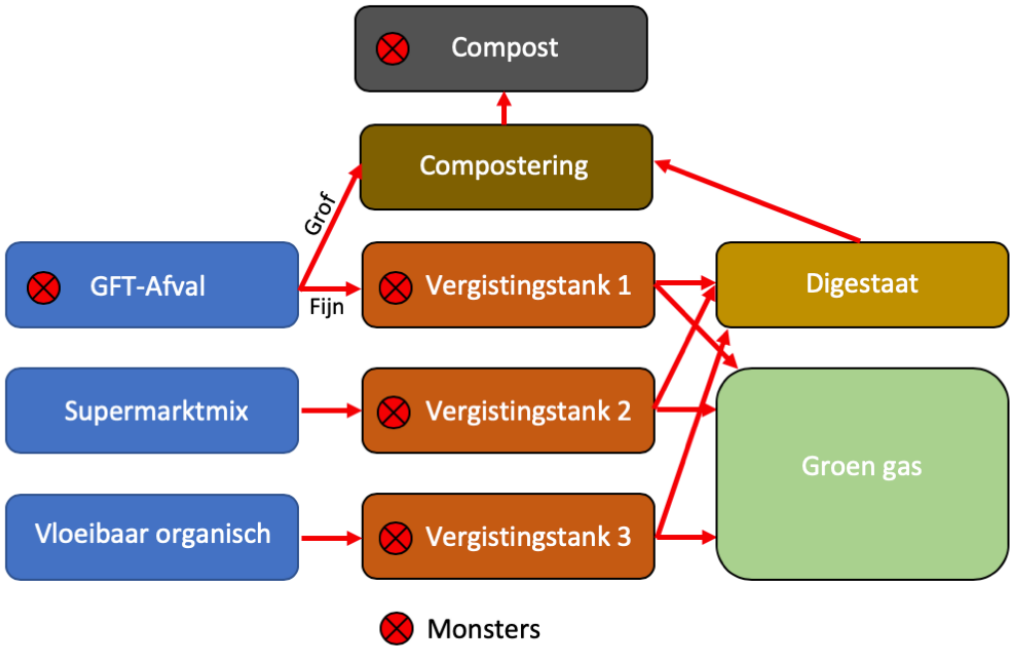
Land- en tuinbouwafval en GFT-afval dat klaarligt voor (co-)vergisting bevatte resistente ***A. fumigatus*** in het geval van bollenafval (19.500 CFU/g), van enigszins vochtige en fijngemaakte graanresten dat naast het bollenafval lag (1200 CFU/g) en van tuinbouwafval (1710 CFU/g). Het bollen- en tuinbouwafval bevat ook azolen. Na co-vergisting is in het bollen- en graanafval geen ***A. fumigatus*** meer aanwezig. In de compost van het tuinbouwafval is het aantal sterk gedaald onder de 1000 naar 480 CFU/g (tabel 3.13 hieronder).
De foto's van figuur 16 op de vorige pagina en figuur 18 op de volgende pagina geven een beeld van de diversiteit van het onderzochte materiaal.

Tabel 3.13 Kenmerken van land- en tuinbouwafval en van (co-)vergist materiaal op co-vergisterlocatie A en B, bij een afvalverwerker: ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg), (gemiddelde van 2 monsters 1A en 2)

Type land- en tuinbouw-afval	**Locatie**	**Kenmerk**	**Ligduur (dagen)**	**Aspergillus (T) (#)**	**Aspergillus (R) (#)**	**Resistentie (%)**	**Azolen (mg/kg)**
Bollenafval	Co-vergister A	Voor vergisting	45	37.200	19.500	52	0,01
Groenten-afval	Co-vergister A	Voor vergisting	2	0	0	0	0,00
Vergist materiaal	Co-vergister A	Na vergisting	80	0	0	0	0,00
Graan-resten	Co-vergister B	Voor vergisting	14	4.200	1.200	29	0,00
Cacao-doppen	Co-vergister B	Voor vergisting	31	18.000	0	0	0,00
Groenten-afval*	Co-vergister B	Voor vergisting	5	0	0	0	0,00
Digestaat	Co-vergister B	Na vergisting	100	0	0	0	0,00
Tuinbouw-afval	Afvalverwerker	Aangevoerd ingangsmateriaal	1	37.200	1.710	5	0,06
Compost	Afvalverwerker	Compostering in tunnels	17	360	480	100	0,02

*vooral boontjes

Bij de energiecentrale waar is bemonsterd, vindt zowel compostering als vergisting plaats. De stappen in deze processen zijn weergegeven in figuur 17 op de volgende pagina. GFT-afval wordt deels gecomposteerd en deels vergist. Het GFT-afval dat is voorvergist, wordt aansluitend gecomposteerd. Supermarktafval wordt direct bij aanvoer in de vergister gebracht (dat is niet in het schema opgenomen, omdat het een aparte afvalstroom betreft).



Figuur 17: Processtappen in vergisting en compostering bij een vergistings-/energiecentrale. Monsterlocaties zijn weergegeven door een rode cirkel met zwart kruis.

Figuur 18: Diversiteit aan land- en tuinbouwafval en (co-) vergist materiaal bij een afvalverwerker/energiecentrale
A (boven, links): GFT afval bij vergistings-/ energiecentrale
B (boven, midden): Vergist materiaal bij vergistings-tank 1
C (boven, rechts): Vergist materiaal bij vergistingstank 2 en 3
D (onder): Compost bij vergistings-/energiecentrale (komt waarschijnlijk uit vergistings-/ composteringscentrale)

Tabel 3.14 Kenmerken GFT, compost en vergist materiaal bij energiecentrale: ligduur in dagen, totale aantallen (T) en resistente (R) A. Fumigatus (CFU/g), percentage resistentie en totale concentratie azolen (mg/kg), (gemiddelde van 2 monsters 1A en 2)

Type land- en tuinbouwafval	Kenmerk	Ligduur (dagen)	Aspergillus (T) (#)	Aspergillus (R) (#)	Resistentie (%)	Azolen (mg/kg)
GFT-afval	GFT-afval	0,5	4.800	540	11	0,03
Compost (3 weken	GFT-compost	21	0	0	0	0,05
Vergist materiaal (GFT-vergister)	Na GFT-vergisting	14	960	180	19	0,10
Vergist materiaal (vloeibaar)	Vergisting van GFT-vergist materiaal	14	0	0	0	0,02
Vergist materiaal (supermarktmix)	Direct vergister in	3	0	0	0	0,02

Het GFT-afval dat klaarlag voor compostering of vergisting bevatte een beperkt aantal resistente ***A. fumigatus*** (540 CFU/g). Na compostering of vergisting is geen resistente ***A. fumigatus*** meer aanwezig. Het vergiste supermarktafval bevat geen ***A. fumigatus***. GFT-afval, compost en vergist materiaal bevat sporen van azolen (zie tabel 3.14 hierboven). Deze azolen (met name imazalil en propiconazool) zijn afkomstig van gebruik in de groente- en fruitteelt.

3.6 Reflectie op de resultaten

3.6.1 sleutelfactoren en resistentie-ontwikkeling

In eerdere studies zijn een aantal sleutelfactoren aangewezen die invloed hebben op de ontwikkeling en het aantreffen van resistente ***Aspergillus fumigatus.*** Dit zijn de aanwezigheid van organisch materiaal, voldoende vocht en zuurstof, de temperatuur, de samenstelling van het materiaal, een ligduur van een aantal dagen en de aanwezigheid van azolen.

Organisch materiaal is aanwezig in alle monsters van het onderzoek. In principe kan ***A. fumigatus*** dus in alle monsters voorkomen. Daar waar geen ***A. fumigatus*** wordt aangetroffen, betreft dat meestal grof hout (in de helft van de gevallen) of compost of digestaat, beide in de eindfase. In de schimmelmetingen blijkt in bijna 75% van de monsters ***A. fumigatus*** voor te komen. In 45% van de monsters is sprake van resistentie. Alle monsters bevatten –voor zover visueel vast te stellen- tevens voldoende **vocht** en **zuurstof**. Alleen de digestaatmonsters waren voornamelijk zuurstofloos. Opvallend is dat in de monsters de **temperatuur** varieerde tussen 11 en 65 °C. De temperatuur range waarbij resistente ***A. fumigatus*** werd aangetroffen varieerde van 11 tot 62 °C. In een van de compostmonsters was de temperatuur 62 °C met 3.600 CFU/g ***A. fumigatus*** en 300 CFU/g resistente ***A. fumigatus***. Asexuele sporen overleven niet boven de 60 °C, maar tussen de 60 en 70 °C is de overleving afhankelijk van de tijdsduur van de blootstelling aan deze temperatuur (Schoustra et al. 2019, van der Wal et al. 2014). Een minimum temperatuur - waarbij de schimmel niet groeit- lijkt niet aan de orde. Bij de laagst gemeten temperatuur (11 °C) zijn hoge gehalten (resistente) ***A. fumigatus*** aangetroffen.

Ten aanzien van deze sleutelfactoren springen verder enkele zaken in het oog.

Samenstelling van het materiaal

Dit is met name bij hout van invloed op het aantreffen van resistentie. ***A. fumigatus*** (resistente en niet-resistente) wordt alleen aangetroffen in opslaghopen met fijne en semi-grove samenstelling van het houtafval. Door hout voor opslag niet te versnipperen of na versnipperen snel (binnen enkele dagen) te verwerken lijkt ontwikkeling van ***A. fumigatus*** in het houtafval niet of nauwelijks mogelijk. Dit lijkt een effectieve methode, waarbij de uitdaging is dit in de praktijk uit te voeren. Hout wordt versnipperd om efficiënter te kunnen vervoeren en soms ook om efficiënt op te kunnen slaan. Wanneer daarom toch versnipperd moet worden is afdekken en snel verwerken een logische aanpak. Dit geldt dan voor elke stap in de afvalhoutketen, dus naast gemeentewerven, biomassawerven en energiecentrales ook voor transport per boot en opslag bij sorteerbedrijven.

Bij groenafval lijkt de samenstelling niet van invloed: er is resistente ***A. fumigatus*** aangetroffen in sterk verschillend materiaal van grove takken tot fijn gras, en in materiaal met en zonder land- en tuinbouwafval. Het vermijden van land- en tuinbouwafval bij de groenafvalcompostering is geen oplossing om de ontwikkeling van resistentie van ***A. fumigatus*** op de biomassawerven te voorkomen. Ook in het groenafval van biomassawerven die geen land- en tuinbouw verwerken worden hoge gehalten resistente ***A. fumigatus*** aangetroffen, van 22.500 tot 7 miljoen CFU/g.

Ligduur en afdekken

De ligduur van de afvalhopen is ook benoemd als sleutelfactor. In het bollenafval bleken afvalhopen die langer dan 14 dagen liggen, grote aantallen resistente ***A. fumigatus*** te bevatten (Schoustra et al. 2019a). Dat is de reden dat voor dit afval door het Ctgb is vastgelegd dat het bollenafval moet worden afgedekt en maximaal 14 dagen opgeslagen mag zijn. Afdekken is door het Ctgb in het protocol overigens opgenomen om verspreiding van sporen te kunnen tegengaan, niet om groei en ontwikkeling van ***A. fumigatus*** te voorkomen. Om groei en ontwikkeling te voorkomen is het nodig afvalhopen zuurstofloos in te kuilen. Dan wordt het schimmelvormingsproces gestopt.

De ligduur van de afvalhopen in de huidige studie varieert tussen 0,5 dag en 912 dagen. In 20% van de monsters waar hoge aantallen resistentie is gevonden, is de ligduur korter dan 14 dagen. De exacte ligduur is echter lastig vast te stellen, omdat materiaal ook eerst in tussenopslag kan hebben gelegen. Afdekken en snelle verwerking van het afval binnen 14 dagen kan sterke ontwikkeling van resistente ***A. fumigatus*** verminderen, maar het is wel nodig te toetsen of deze verwerkingstijd voldoende effectief is.
Voor biomassawerven is een korte opslagduur lastig. Organisch materiaal komt pieksgewijs vrij. Denk bijvoorbeeld aan bermen die in de zomer gemaaid worden en bomen die in de winter gesnoeid worden. Dit materiaal wordt bijna continu aangevoerd en opgeslagen. Opslag van dit aangevoerde materiaal, voordat verwerking tot compost kan plaatsvinden, is daarom noodzakelijk. Toch geven enkele biomassawerven aan het materiaal wel snel in de composteringsproces te brengen. Daar waar dit mogelijk is, is dat dus van belang. Daar waar langere bewaring nodig is, is afdekken een te nemen maatregel. De opslag van materiaal bij (co-)vergistingslocaties is meestal relatief kort (enkele dagen), maar ook hier kan afdekken of inkuilen de verspreiding resp. ontwikkeling van ***A. fumigatus*** reduceren.

Azolen aanwezig

De aanwezigheid van azolen is ook een sleutelfactor, omdat de resistentie in ***A. fumigatus*** geïnduceerd wordt door azolen. In alle houtmonsters met resistentie zijn ook azolen aangetroffen. Dit zijn met name de twee azolen die worden toegepast bij houtbehandeling, te weten tebuconazool en propiconazool.
In een deel van de groenafvalmonsters met resistente ***A. fumigatus*** zijn echter geen azolen aangetroffen. Dit is opmerkelijk. In eerdere studies (van der Wal et al. 2014, Verweij et al. 2017) werden in groenafval naast resistente ***A. fumigatus*** wel altijd azolen aangetroffen, meestal in lage concentraties net boven de detectielimiet (0,01 mg/kg). Er zijn verschillende verklaringen voor de afwezigheid van azolen in sommige monsters met resistente ***A. fumigatus***:

- Ten eerste kan de grote heterogeniteit van het bemonsterde materiaal de oorzaak zijn, waardoor op de ene plek in de hoop wel azolen aanwezig zijn en op een andere niet. Zo valt op dat op een

van de biomassawerven aan het eind van de compostering in compost wel azolen zijn aangetroffen (0,01 mg/kg), terwijl in het groenafval dat klaarligt voordat compostering begint geen detecteerbare gehalten werden gemeten.
- Een tweede verklaring is dat de resistentie al ontstaan kan zijn voordat het materiaal op de biomassawerven is opgeslagen, bijvoorbeeld in een tussenopslag waar wel azolen aanwezig waren.
- Ten derde kunnen in de monsters wel azolen aanwezig zijn, maar in zulke lage hoeveelheden dat ze in de analyse niet aangetroffen worden. Uit de literatuur (Van der Wal et al. 2014, Verweij et al. 2017, Schoustra et al. 2019) blijkt dat zeer lage concentraties azolen al resistentie kunnen veroorzaken.
- Tenslotte kunnen sporen van resistente ***A. fumigatus*** zijn ingewaaid in de groenafvalhoop, die zich in de hoop verder ontwikkeld hebben. Resistente ***A. fumigatus*** lijkt namelijk in situaties zonder azolen even goed te groeien als niet-resistente ***A. fumigatus***.

3.6.2
Resistente Aspergillus fumigatus en aantallen CFU/g

De aantallen (resistente) ***Aspergillus*** in de monsters varieert zeer sterk. Het hoogste aantal ***A. fumigatus*** betreft bijna 40 miljoen CFU/g, met een aantal van 7 miljoen resistente CFU/g.
In afstemming met WUR is gesteld dat er sprake is van hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** wanneer een monster > 1.000 CFU/g bevat. Situaties met aantallen > 10.000 CFU/g wordt benoemd als zeer hoog.

3.6.3
Resistentiebepaling en heterogeniteit

Resistentiebepaling in monsters vindt plaats door toepassen van itraconazool en tebuconazool. Metingen van resistentie op tebuconazool geven in de monsters niet altijd dezelfde uitkomsten als meten op itraconazool. Ook in eerdere studies (Schoustra et al. 2019a) in bollenafval is dit geconstateerd. Dit heeft te maken met de heterogeniteit van de monsters en ook met het feit dat de kruisresistentie tussen verschillende azolen niet 100% is. Resistentie tegen het ene azool, betekent niet automatisch exact dezelfde mate van resistentie tegen een ander azool. Dat is ook een van de redenen dat bij de resistentiebepaling twee azolen worden gebruikt bij het bepalen van aantallen en het percentage resistentie.

3.6.4
Bewaren, omzetten en metingen in de lucht

De ontwikkeling van resistente ***A. fumigatus*** vindt met name plaats in bewaarhopen. Daar waar regelmatige omzetting plaatsvindt gedurende het composteringsproces -zoals bij de biomassa-werven- nemen de aantallen (resistente) sterk ***A. fumigatus*** af, met name vanwege de hoge temperatuur die dan wordt bereikt (60 – 65 °C). Bij de bewaarhopen bij gemeenten is meestal sprake van tussenopslag zonder omzetting. In hoeverre sporen van ***A. fumigatus*** vrijkomen bij composteerbedrijven, is samengevat door Hagens et al. (2011). Zij gaan in op bio-aerosolen in de lucht. Dit zijn kleine druppeltjes of deeltjes in de lucht waarin (delen van) micro-organismen, zoals bacteriën, schimmels en virussen aanwezig zijn. Er zijn metingen uitgevoerd op composterings-bedrijven, zowel beneden- als bovenwinds. Op deze wijze zijn achtergrondniveaus van onder andere sporen van ***A. fumigatus*** bepaald: < 100 tot 10.000 CFU/m^3. Dit is vergelijkbaar met achtergrondniveaus in landbouwgebieden, maar hoger dan in onbelaste gebieden. Wanneer echter activiteiten plaatsvonden op het composteerbedrijf, zoals versnipperen van groenafval of het omzetten van compost, was benedenwinds op 25-40 m afstand een sterke toename te meten van ***A. fumigatus***. Benedenwindse monsterpunten, op 100-300 meter afstand, gaven meestal geen verhoging meer te zien. Meteorologische omstandigheden, zoals windsnelheid en windrichting, waren bepalend voor de verspreiding; het seizoen had minder invloed.
Recent zijn door onderzoekers van Rothamsted Research Centre in drie Europese landen luchtmonsters (in elk land een locatie) geanalyseerd. Op deze locaties zijn achtergrondconcentraties

van resistente ***A. fumigatus*** aangetroffen (Croplife 2020). De locaties zijn willekeurig gekozen en bevinden zich –voor zover bekend- niet in de nabijheid van mogelijk hotspots.

3.6.5
Maatregelen en voorwaarden bollenteelt

Ten aanzien van bollenafval zijn inmiddels voorwaarden gesteld aan de bewaring. Vanaf 25 februari 2021 is een wettelijk vastgelegd protocol ingesteld hoe om te gaan met het bollenafval van bedrijven die azolen toepassen in de teelt. Het nieuwsbericht en protocol over de azolenmiddelen in de bollenteelt is te vinden op:
ctgb.nl/actueel/nieuws/2021/02/25/strenge-regels-voor-gebruik-azolen-in-bollenteelt.
Het protocol schrijft voor dat azoolhoudend afval moet worden afgedekt en maximaal twee weken mag worden opgeslagen. Het mag onder voorwaarden worden verbrand, vergist of gecomposteerd en uitgereden. Of deze maatregelen afdoende zijn gaat komend seizoen (2021) gemonitord worden.

3.6.6
Resistente Aspergillus in bewaarhopen en risico's voor patiënten

In bewaarhopen van hout- en groenafval komen soms grote aantallen resistente ***A. fumigatus*** voor. Sporen van deze schimmel verspreiden zich via de lucht. Resistente ***A. fumigatus*** vormt met name een risico voor patiënten met een verzwakt immuunsysteem en met longinfecties. Recent is gebleken dat patiënten met ernstige COVID19-infectie ook extra gevoelig zijn voor ***A. fumigatus***. Onbekend is hoe infectie met (resistente) sporen van ***A. fumigatus*** exact plaatsvindt. Verbanden tussen gevonden aantallen en verspreiding, in relatie tot blootstelling en gezondheidsrisico's voor de mens zijn nog niet aan te geven. Wel hebben Wageningen Universiteit en Radboud UMC, door onderzoek van het DNA van de resistente ***A. Fumigatus,*** aannemelijk gemaakt dat de ***A. fumigatus*** -sporen die voor besmetting van patiënten zorgen, uit het milieu afkomstig zijn (Schoustra et al. 2019b). Identieke resistentie-mutaties in het milieu (afvalhopen) en in patiënten wijzen op een rol van 'hotspots' bij infectie van patiënten (Schoustra et al. 2019b). Het vraagstuk wordt momenteel verder onderzocht, onder meer via onderzoek naar transmissie.
Of werknemers die werken met groen- en houtafval waar afvalhopen met resistente ***A. fumigatus*** aanwezig zijn, een verhoogd risico op infectie lopen, kan nog niet worden aangegeven, omdat nog niet goed bekend is hoe besmetting met ***A. fumigatus*** plaatsvindt. Wel is bekend dat gezondheids-klachten kunnen optreden bij medewerkers van bedrijven, die werken met grondstoffen die rijk zijn aan pathogene micro-organismen. ***Aspergillus fumigatus*** is een voorbeeld van zo'n micro-organisme, maar er zijn meer pathogene schimmels, bacteriën en virussen die zich via bio-aerosolen verspreiden (Hagens et al. 2011).

Compost en kringloop

Het verwerken van groenafval en land- en tuinbouwafval tot compost, is een belangrijk proces, dat bijdraagt aan het benutten van reststoffen. Naast particuliere en professionele toepassing van compost in tuinonderhoud, is met name het gebruik in de land- en tuinbouw belangrijk. Compost wordt toegepast als bodemverbeteraar en is van belang voor het op peil houden - of brengen - van het organischestofgehalte in de bodem. Gebruik van compost past tevens naadloos in de door de overheid gestimuleerde kringlooplandbouw. Het ontstaan en de aanwezigheid van resistente ***A. fumigatus*** in groenafvalhopen die worden opgeslagen voor compostering, is voor de bedrijven lastig. Biomassawerven kunnen er niets aan doen dat het groenafval, dat zij verzamelen, soms azolen bevat. Azolen worden, in tegenstelling tot de situatie in de bollenteelt, niet door de biomassawerven zelf gebruikt. Daar waar azolen in lage concentraties voorkomen in het groenafval en/of de compost, zijn de stoffen afkomstig uit toepassingen door derden. Dit geldt ook voor het houtafval. Men krijgt afval en daar blijken azolen in te zitten.
Het aantreffen van resistente ***A. fumigatus*** in het groenafval op biomassawerven, en de sterke afname in het composteringsproces is consistent met de eerdere studies (van der Wal et al. 2014 en Verweij et al. 2017). Ook het aantreffen in de verschillende groenafvaldeelstromen in die studies werd in de huidige studie bevestigd: In de monsters waar deelstromen van beschikbaar zijn (takken, maaisel, en in 1 geval bollenafval) komen hoge aantallen resisente ***A. fumigatus*** voor.

In Nederland vindt ook opslag en verwerking plaats in kleine groenafvalhopen door het hele land (Leendertse et al. 2021a). Groenafval in kleine opslaghopen is divers. Het betreft groenafval in de vorm van slootmaaisel, bermmaaisel, bladafval, resten uit land- en bosbouw, houtsnippers, etc. Soms betref het kleine hopen met resten uit land/bosbouw/bermmaaisel/blad, die in de nazomer of najaar opgehoopt worden en in het voorjaar direct ondergewerkt worden. Deze hopen vallen onder de vrijstelingsregeling plantenresten (resten bermmaaisel/rest uit land en bosbouw en natuurgras mogen binnen een straal van 5 km ondergewerkt worden. Deze hopen mogen nu nog van het najaar tot het voorjaar blijven liggen). Dit wordt ook wel de Kleine Kringloop genoemd.

Hoewel de directe relatie tussen hotspots en infectie van patiënten (nog) niet is aangetoond, heeft de overheid, in het geval van bollenteelt, uit voorzorg besloten om maatregelen in te stellen voor afval van bollen die met azolen zijn behandeld. Ook in het geval van groenafvalhopen ligt het voor de hand preventieve maatregelen te nemen. Het niet meer innemen van land- en tuinbouwafval lijkt niet afdoende, omdat ook bij biomassawerven zonder inname van dit afval hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** worden aangetroffen. Het ligt voor de hand dat maatregelen - zoals snel verwerken of afdekken - worden genomen, om de ontwikkeling van hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** in groenafvalhopen te voorkomen. Snel verwerken is voor sommige biomassawerven lastig uitvoerbaar, omdat groenafval pieksgewijs vrijkomt, maar in een continue stroom verwerkt wordt. Via afdekken is de ontwikkeling van hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** ook te remmen.

4

Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

1. **Houtafval** bevat, in een beperkt aantal gevallen, hoge aantallen resistente ***Aspergillus fumigatus***. In B-hout is sprake van zeer hoge aantallen resistentie (van 8.430 tot 155.250 CFU/g) in 13% van de monsters (biomassawerven en energiecentrale), in het C-hout in 8% van de monsters (biomassawerf 87.500 CFU/g). Deze monsters bevatten ook azolen (met name propiconazool en tebuconazool); 75% van de houtmonsters bevatten deze azolen. Resistente ***A. fumigatus*** is alleen aangetroffen in hout dat is versnipperd tot semi-grof of fijn materiaal. Het versnipperen en op een hoop bewaren van B- en C-houtafval dat azolen bevat, vormt een risico voor de ontwikkeling van resistente ***A. fumigatus***.

2. In **kleine opslaghopen met groenafval** is sprake van hoge resistentie (> 1000 CFU/g) in 30% van de monsters. Groenafval in de kleine opslaghopen met sloot- of bermmaaisel, bevat niet of nauwelijks resistentie. In drie van de kleine afvalhopen (met schoffelafval en met een mix van gras, stro en riet) is sprake van zeer hoge aantallen resistente ***Aspergillus fumigatus*** (10.000 – 600.000 CFU/g). Opvallend is dat in alle drie van deze hopen sprake is van grote diversiteit aan materiaal. In deze hopen zijn geen azolen gedetecteerd. Dit kan te maken hebben met de combinatie van lage concentraties die onder de detectielimiet liggen en heterogeniteit van het materiaal, waardoor op de ene plek in de afvalhoop wel azolen aanwezig zijn en op de andere plek niet. Ook kunnen sporen van resistente ***A. fumigatus*** via de lucht van elders zijn aangevoerd en in het materiaal zijn uitgegroeid tot hoge aantallen. De heterogeniteit van de kleine groenafvalhopen maakt het nog niet mogelijk om duidelijk aan te geven wanneer resistentie-ontwikkeling in deze hopen op kan treden.

3. Het opslaan van **groenafval op gemeentewerven** leidt een enkele keer tot de ontwikkeling van resistente ***Aspergillus fumigatus***, waarbij gehalten van maximaal 2.550 CFU/g zijn aangetroffen, en geen detecteerbare gehalten azolen.

4. Het **groenafval dat is opgeslagen op biomassawerven** bevat zeer hoge aantallen resistente ***Aspergillus fumigatus*** variërend van 22.500 tot 7 miljoen CFU/g. Gedurende het composteringsproces verminderen de resistente aantallen (variërend van 3.000 tot 19.000 CFU/g) en in het eindproduct (compost) zijn de aantallen nagenoeg nul (variërend van 0 tot 600 CFU/g). Detecteerbare gehalten azolen zijn slechts beperkt aangetroffen. Evenals in eerdere studies blijken verschillende deelstromen (takken, maaisel en bollenafval) elk hoge aantallen resistentie te bevatten.

5. **Land- en tuinbouwafval en GFT dat klaarligt voor (co-)vergisting** (bij (co-)vergisters) bevat resistente ***Aspergillus fumigatus***; in het geval van bollenafval (zeer hoog, 19.500 CFU/g), graanresten (1.200 CFU/g), tuinbouwafval (1.710 CFU/g) en GFT-afval (540 CFU/g). Na (co-) vergisting is in alle gevallen geen ***A. fumigatus*** meer aanwezig. Bollenafval, GFT-afval en vergist materiaal bevatten sporen van azolen. Deze azolen zijn afkomstig van gebruik in de bollen- en groente- en fruitteelt.

4.2 Aanbevelingen

4.2.1 Praktijk

1. Advies aan de houtverwerkingssector is azoolhoudend B- en C-hout na versnipperen niet op te slaan, maar zo snel mogelijk te verwerken, bijvoorbeeld in de verbrandingsovens. Indien opslag noodzakelijk is, adviseren we de snippers af te dekken. Advies is ook de effectiviteit van deze maatregelen te monitoren.

2. Aanbeveling aan de groencomposteersector is om mogelijke preventieve maatregelen (bijvoorbeeld afdekken) aan te dragen en de effectiviteit via een meetprogramma te testen door materiaal- en luchtmetingen. Effectieve maatregelen kunnen dan aansluitend worden toegepast om uit voorzorg de ontwikkeling van hoge aantal resistente ***Aspergillus fumigatus*** in groenafvalhopen te voorkomen. Als onderdeel van het meetprogramma is het advies op meerdere biomassawerven in groenafvaldeelstromen te meten voor verder inzicht in de relatie tussen aard en herkomst van groenafvaldeelstromen en het aantreffen van resistente ***A. fumigatus***. Wij adviseren de sector om hiermee op korte termijn pro-actief aan de slag te gaan in samenwerking met relevante stakeholders.

Adequate maatregelen zijn belangrijk om de positieve bijdrage van compost voor de land- en tuinbouw optimaal te kunnen blijven benutten, ook in het kader van de door de overheid gestimuleerde kringlooplandbouw.

3. Aanbeveling aan de (co)vergistingssector is om het binnen enkele dagen voorvergisting van het GFT-afval en (co-)vergisting van land- en tuinbouwafval te continueren en geen langere bewaring toe te passen (daar waar dat het geval is). Daarmee is de ontwikkeling van hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** in deze keten te voorkomen. Ook kan door afdekken verspreiding van de sporen beperkt worden of via inkuilen (zuurstofloos maken van het materiaal) groei en ontwikkeling gestopt worden. Mits praktisch uitvoerbaar is inkuilen een effectieve maatregel.

4. Het advies aan sectoren die betrokken zijn bij de Kleine Kringloop met lokale opslag en/of compostering is te testen of door snelle verwerking, afdekking of inkuilen de ontwikkeling van hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** in de kleine groenafvalhopen te voorkomen zijn. En aansluitend uit voorzorg effectieve maatregelen toe te passen.

5. We adviseren het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat (I&W) en Rijkwaterstaat (RWS) om met de ketens van houtverwerking, compostering (inclusief de Kleine Kringloop) en (co)vergisting, de aanbevolen maatregelen te bespreken en afspraken te maken over invoering en monitoring.

4.2.2
Verder onderzoek

6. Het advies aan de ministeries van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) en I&W is om een aantal kleine, lokale afvalhopen, die heterogeen zijn, te laten bemonsteren, om de oorzaak van de resistentie in dit type hopen te achterhalen. Tevens adviseren we de ministeries om in het recent gestarte onderzoek naar samenstelling en werking van bokashi, ook metingen aan ***Aspergillus fumigatus*** en azolen te verrichten, ook na het toepassen van de bokashi op de bodem. Dat is een efficiënte manier om systematisch inzicht te krijgen of bij deze methode inderdaad geen ontwikkeling van resistentie optreedt.

7. Aanbeveling aan het ministerie van VWS is om bij hotspots luchtmetingen uit te laten voeren, om na te gaan in welke hoeveelheden resistente ***A. fumigatus*** -sporen vrijkomen en over welke afstand de sporen zich verspreiden. Het ligt voor de hand deze metingen uit te voeren bij hotspots waar zeer hoge aantallen resistente ***A. fumigatus*** zijn aangetroffen en deze metingen ook uit te voeren in situaties waar maatregelen genomen zijn.

8. Het advies is om van de monsters met resistente ***A. fumigatus*** uit deze studie, de DNA-sequenties te analyseren, om te bepalen of de gevonden sequenties overeenkomen met de in patiënten aangetroffen resistentie, om na te gaan of de resistentiemechanismen overeenkomen. Gezien de koppeling met de humane gezondheid, ligt het voor de hand dat het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) hierin het voortouw neemt.

9. Tenslotte is het advies om na gaan of een gespecialiseerd laboratorium, via aangepaste technieken, de detectielimiet van azolen kan verlagen. Wanneer dit mogelijk is kunnen monsters waarin zeer hoge aantallen resistente ***A. Fumigatus,*** maar geen azolen, zijn aangetroffen, opnieuw op azolen geanalyseerd worden.

Referenties

Croplife international, 2020. Summary of the Rothamsted research project "Understanding the sources and spread of azole resistance in environmental *Aspergillus fumigatus* populations", Rothamsted Research, Harpenden.

Fraaije, B., S. Atkins, S. Hanley, A. Macdonald and J. Lucas 2020. The Multi-Fungicide Resistance Status of Aspergillus fumigatus Populations in Arable Soils and the Wider European Environment. Frontiers in Microbiology 11: 1-17.

Hagens, W.I., S.A. Rutjes, M. Rutgers, P.J.C.M. Janssen, P.H. Fischer, A. Dusseldorp 2011. Gezondheidsaspecten van het wonen nabij composteerbedrijven; Een literatuurstudie. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Bilthoven.

Jeanvoine, A., S. Rocchi, G. Reboux, N. Crini, G. Crini and L. Millon 2017. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in sawmills of Eastern France. Journal of Applied Microbiology 123; 172 – 184

Kemoi, E.K., A. Nyerere, C.C. Bii 2018. Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* from fungicide-experienced soils in Naivasha Subcounty and Nairobi county, Kenya. International Journal of Microbiology. Volume 2018, Article ID 7147938.

Leendertse, P.C., A. J. van der Wal, L.C.N. Vlaar, W. J. van der Weijden, W.J.G. Melchers, and P. E. Verweij 2015. The use of azole fungicides in the Netherlands and preliminary indications of hot spots. Academy Colloquim Fungicides and azole resistance selection. KNAW-meeting 2-3 March 2015, Amsterdam.

Leendertse, P.C., R. Gommer, J. van Beek 2021a. Groen- en houtafval als bron van azolen-resistente schimmel *Aspergillus fumigatus*. deel A: deskstudie. Including English summary: Green and wood waste are probable sources of azole-resistant resistant *Aspergillus fumigatus*. Part A: desk study. CLM-rapport, Culemborg.

Leendertse, P.C., R. Gommer, J. van Beek 2021c. Verkenning naar de aanwezigheid van resistente *Aspergillus fumigatus* in de land- en tuinbouwketen. Including English summary : Exploring the occurrence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the agricultural and horticultural chain. CLM-rapport, Culemborg.

Rocchi, S., M. Ponçot, N. Morin-Crini, A. Laboissière, B. Valot, C. Godeau, C. Lechenault-Bergerot, G. Reboux, G. Crini, L. Millon 2018. Determination of azole fungal residues in soils and detection of *Aspergillus fumigatus*-resistant strains in market gardens of Eastern France. Environmental Science and Pollution Research 25: 32015-32023.

Schoustra, S.E., J. Zhang, B.J. Zwaan, A.J.M. Debets, P. Verweij, D. Buijtenhuijs en A.G. Rietveld 2019a. New insights in the development of azole-resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands. RIVM Letter report 2018-0131, Bilthoven.

Schoustra, S.E. , A.J.M. Debets, A. J.M.M. Rijs, J. Zhang, E. Snelders, P. C. Leendertse, W. J.G. Melchers, A.G. Rietveld, B. J. Zwaan en P. E. Verweij 2019b. Environmental hotspots for azole resistance selection of *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands. Emerging Infectious Diseases 25: 1347-1353.

Van der Wal, A.J., L. Vlaar, P.C. Leendertse, P. E. Verweij, W. Melchers en T. Rijs 2014. Verkenning resistentie-ontwikkeling van de schimmel *Aspergillus fumigatus*. CLM rapport 855, Culemborg.

Van der Weijden, W. en A.J. van der Wal 2012. Resistente schimmels zijn tijdbom. Nieuwe Oogst, maart 2012.

Verweij, P.E., E. Snelders, G.H.J. Kema, E. Mellado & W.J.G. Melchers 2008. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus:* a side-effect of environmental fungicide use? Lancet Infect Dis 2009; 9: 789–95.

Verweij, P. E., Rietveld, A. Melchers, W. Leendertse, P.C. Hoftijser, E. en B.J. Zwaan (2017) Azole-resistance selection in *Aspergillus fumigatus* –final report-. In: Report on research commissioned by Netherlands Minstries of Health and of Agriculture. CLM, Wageningen University, Radboudumc, RIVM, Utrecht.

Verweij, P. E., J. A. Lucas, M. C. Arendrup, P. Bowyer, A. J.F. Brinkmann, D.W. Denning, P. S. Dyer, M.C. Fisher, P.L. Geenen, U. Gisi, D. Hermann, A. Hoogendijk, E. Kiers, K. Lagrou, W. J.G. Melchers, J. Rhodes, A.G. Rietveld, S.E. Schoustra, K. Stenzel, B.J. Zwaan & B. A. Fraaije (2020). The one health problem of azole-resistance in Aspergillus fumigatus: current insights and future research agenda. Fungal biology review 34: 202-214.

CLM Onderzoek en Advies

Postadres
Postbus 62
4100 AB Culemborg

Bezoekadres
Gutenbergweg 1
4104 BA Culemborg

T 0345 470 700

www.clm.nl