



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Antibioticaresistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen in mest

RIVM Briefrapport 2019-0112
H. Schmitt et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Antibioticaresistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen in mest

RIVM Briefrapport 2019-0112
H. Schmitt et al.

Colofon

© RIVM 2019

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

DOI 10.21945/RIVM-2019-0112

H. Schmitt (auteur), RIVM
H. Blaak (auteur), RIVM
P. Hoeksma (auteur), WUR
M. van de Schans (auteur), WFSR
M. Kemper (auteur), RIVM
S. de Rijk (auteur), RIVM
A. M. de Roda Husman (auteur), RIVM

Contact:

Heike Schmitt

Z&O

RIVM, Centrum Zoonosen en Omgevingsmicrobiologie (Z&O), onderdeel van het Centrum Infectieziektenbestrijding (CiB)
heike.schmitt@rivm.nl

Met dank aan: alle betrokken mestverwerkers en veehouders.

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS).

Dit is een uitgave van:

www.rivm.nl

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
Nederland

Publiekssamenvatting

Antibioticaresistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen in mest

In mest blijken bacteriën voor te komen die ongevoelig (resistent) zijn voor bepaalde soorten antibiotica. Ook zijn er in mest resten van antibiotica gevonden. Mest van landbouwhuisdieren, zoals koeien en varkens, wordt gebruikt om landbouwgrond mee te bemesten.

Dit blijkt uit onderzoek van het RIVM. Wetenschappers onderzochten hoeveel resistente bacteriën via mest in het Nederlandse milieu (in bodem en water) terechtkomen. In de onderzochte mest zijn bijzonder resistente micro-organismen (BMRO), namelijk de ESBL-producerende bacterie *E. coli* gemeten. Het voorkomen van deze bacterie verschilt per diersoort. Het komt tussen 40 procent (mest van leghennen) en 90 procent (mest van kalveren) voor.

De hoogste concentraties ESBL-producerende *E. coli* zijn gevonden in mest van leghennen. De hoeveelheid mest die op het land wordt gebracht verschilt per diersoort. Doordat er veel minder pluimveemest op het land terecht komt dan mest van andere diersoorten, belasten alle soorten mest het milieu met ongeveer dezelfde hoeveelheid.

Naast mest van landbouwhuisdieren is afvalwater de belangrijkste 'bron' waardoor resistente bacteriën in het milieu belanden. Resistente bacteriën komen met menselijke ontlasting in afvalwaterzuiveringsinstallaties terecht. Doordat de bacteriën daar niet helemaal worden verwijderd, belanden ze dus in het oppervlaktewater, zoals een rivier. Wetenschappers laten met dit onderzoek zien dat de totale hoeveelheid resistentie die vanuit mest op de bodem belandt ongeveer hetzelfde is als de hoeveelheid die vanuit afvalwater in het oppervlaktewater terecht komt. Vanuit mest en bodem belandt slechts een deel van de resistente bacteriën in oppervlaktewater. Daarom is afvalwater van mensen een grotere bron van resistente bacteriën in water dan mest. Mensen kunnen in aanraking komen met resistentie in het milieu na contact met water.

Kernwoorden: ESBL, BMRO, mest, afvalwater, milieu, landbouwhuisdieren, antibioticaresistentie

Synopsis

Antibiotic resistant bacteria, resistance genes and residues of antibiotics in manure

Bacteria that are resistant to certain types of antibiotics are present in manure. In addition, residues of antibiotics have been found in manure. Manure from farm animals, such as cows and pigs, is used to fertilise farmland.

This was the conclusion of a study carried out by RIVM (National Institute for Public Health and the Environment). Scientists investigated how many resistant bacteria end up in the environment of the Netherlands (in soil and water) via manure. The manure investigated was found to contain highly resistant microorganisms (HRMO), namely the ESBL producing *E. coli* bacteria. The incidence of these bacteria differs per species of animal. It is found in between 40% (manure from laying hens) and 90% (manure from calves) of samples.

The highest concentrations of ESBL producing *E. coli* were found in the manure of laying hens. The quantity of manure spread on the soil differs per animal species. Since the amount of poultry manure applied on farmland is much less than the amount of manure from other animal species, the different types of manure all have approximately the same impact on the environment.

Besides manure from farm animals, waste water is the most important source of resistant bacteria ending up in the environment. Resistant bacteria end up in waste water treatment facilities via human faeces. As these bacteria are not completely removed in these facilities, they end up in surface water such as rivers. Through this study, scientists show that the total number of resistant bacteria that end up in the soil via manure is approximately the same as the number that end up in surface water via waste water. Only a part of the resistant bacteria present in manure and soil ends up in surface water. Waste water from humans therefore makes a greater contribution to resistant bacteria in surface water than does manure. People can come into contact with resistant bacteria in the environment via contact with water.

Keywords: ESBL, HRMO, manure, wastewater, environment, farm animals, antibiotic residues, antibiotic resistance genes.

Inhoudsopgave

Samenvatting — 9

1 Inleiding — 13

- 1.1 Aanleiding — 13
- 1.2 Doel — 13
- 1.3 Aanpak — 13
- 1.4 Achtergrond — 14
 - 1.4.1 Antibioticaresistentie in mest — 14

2 Methoden — 15

- 2.1 Monsternamen — 15
- 2.2 Analyse van ESBL-EC en *E. coli* in mest — 15
- 2.3 Analyse van resistentiegenen in mest — 17
- 2.4 Analyse van residuen van antibiotica in mest — 17
- 2.5 Berekenen van vrachten — 18

3 Resultaten — 19

- 3.1 Prevalentie en concentraties van ESBL-EC en *E. coli* in mest — 19
- 3.2 Prevalentie en concentraties van resistentiegenen in mest — 21
- 3.3 Prevalentie en concentraties van antibiotica in mest — 23
- 3.4 Vrachten van ABR in mest — 25
 - 3.4.1 Emissies van ESBL-EC met mest naar landbouwgrond — 25
 - 3.4.2 Emissies van resistentiegenen met mest naar landbouwgrond — 26
 - 3.4.3 Emissies van antibiotica met mest naar landbouwgrond — 26
 - 3.4.4 Afspoeling van bacteriën en resistentiegenen van landbouwgrond naar oppervlaktewater — 27
 - 3.4.4.1 Vrijzetting van bacteriën uit mest en invloed van neerslag — 27
 - 3.4.4.2 Inactivatie van bacteriën — 28
 - 3.4.4.3 Mestapplicatie — 28
 - 3.4.4.4 Observaties op stroomgebiedsschaal — 28
- 3.5 Vrachten van ABR – vergelijking van mest en humaan afvalwater — 28

4 Discussie — 31

5 Conclusies — 33

6 Annex — 35

- 6.1 Analyse van antibioticaresiduen — 35
 - 6.1.1 Analysis of tetracyclines, sulfonamides, macrolides and quinolones — 35
 - 6.1.2 Analysis of aminoglycosides — 35

7 Referenties — 37

Samenvatting

Aanleiding en doel

De belangrijkste bronnen en routes waarlangs antibioticaresistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresten (hier gezamenlijk ABR genoemd) het milieu bereiken zijn via mest en afvalwater. De aanwezigheid van resistente bacteriën in mest is in Nederland tot nu toe alleen onderzocht in een kleine steekproef. Dit rapport heeft tot doel met behulp van een grotere steekproef de concentraties van resistente bacteriën, residuen van antibiotica en resistentiegenen in dierlijke mest en de emissies naar het milieu te kwantificeren, en deze met emissies uit menselijk afvalwater te vergelijken.

Aanpak

In mestmonsters verkregen na opslag van mest op de boerderij werden het voorkomen en de concentraties van ESBL-producerende *E. coli* (ESBL-EC), van 2 resistentiegenen en van antibiotica onderzocht. Er zijn mestmonsters genomen van vleesvarkens, zeugen, melkkoeien, kalveren, leghennen en vleeskuikens. In combinatie met de totale hoeveelheden mest worden deze resultaten geëxtrapoleerd naar de totale hoeveelheden ABR die jaarlijks met mest op het milieu worden geloosd. Daarnaast zijn literatuurgegevens over de afspoeling van bacteriën in mest naar oppervlaktewater gebruikt om de hoeveelheid ABR uit mest te kunnen vergelijken met de hoeveelheid ABR die uit humane bronnen in oppervlaktewater komt.

*ESBL-producerende *E. coli* in mest*

In 101 mestmonsters genomen in de periode 2016 en 2017 werd de percentage positieve monsters (prevalentie) en concentratie van ESBL-EC en *E. coli* bepaald en samengevat met gegevens uit een eerdere monsternamen in 2013/2014. ESBL-EC werden in alle onderzochte mestsoorten gevonden. De prevalentie lag, afhankelijk van de mestsoort, tussen 42% en 90% en was het hoogst in kalverenmest en varkensmest. De hoogste concentratie ESBL-EC werd gevonden in mest van leghennen, en de laagste in mest van melkvee.

Resistentiegenen in mest

Er werden twee resistentiegenen onderzocht die coderen voor vaak gebruikte antibiotica: *sul1* voor sulfonamide resistentie en *ermB* voor macrolide resistentie. De genen *sul1* en *ermB* werden in nagenoeg alle mestmonsters (n=94) aangetroffen. De hoogste concentraties werden in mest van vleeskuikens gevonden (rond 10^{10} kopieën / g), in melkvee waren de concentraties het laagst (rond 10^8 kopieën / g), in overeenstemming met ander internationaal onderzoek.

Antibioticaresiduen in mest

In de onderzochte mestmonsters (n=100) werden een aantal antibiotica gevonden. Kalverenmest bevatte het grootste aantal verschillende antibiotica (17) en de hoogste concentraties van antibiotica. Tetracyclines, sulfonamides en macroliden werden het vaakst aangetroffen, in overeenstemming met hun gebruik en hoge stabiliteit. Ook fluorochinolonen werden aangetroffen, terwijl deze in Nederland

zeer beperkt worden ingezet. De hoogste concentraties lagen bij enkele µg/kg.

Vrachten van ESBL-EC en resistentiegenen in mest

Van alle dierlijke mest wordt het grootste deel gebruikt voor bemesting en op landbouwgrond uitgereden. Daarom werd het aantal ESBL-EC dat per jaar met mest op het land wordt gebracht berekend (de vracht of jaaremissie). De vracht wordt berekend uit de concentratie ESBL-EC in mest en de jaarlijkse hoeveelheid uitgereden mest. Ondanks verschillen in de hoeveelheden uitgereden mest tussen de diersoorten dragen zowel kalverenmest, mest van melkvee en mest van varkens en zeugen ongeveer even veel bij aan de totale hoeveelheid ESBL-EC, die uit de mest in het milieu komt. De bijdrage van pluimveemest is iets lager dan de bijdrage van de andere mestsoorten, vooral omdat de hoeveelheid uitgereden pluimveemest laag is in vergelijking met de andere mestsoorten. In totaal worden ongeveer 10^{15} - 10^{16} ESBL-EC met dierlijke mest op landbouwgrond uitgebracht. De onzekerheid van deze schattingen, veroorzaakt door de variaties in de gevonden ESBL-EC concentratie per monster, is relatief groot (95% percentiel tot 10 keer hoger). De jaaremissies van de resistentiegenen *sul1* en *ermB* bedragen ongeveer 10^{19} kopieën. Ook hier is de onzekerheid van de schattingen groot (95% percentiel ongeveer 5 keer hoger).

Vrachten van ABR uit mest in vergelijking met vrachten uit afvalwater

De vracht aan ESBL-EC die met mest het Nederlandse milieu bereiken is binnen de onnauwkeurigheid van de schattingen gelijk aan de vracht die met afvalwater (uit RWZIs, overstorten en foutaansluitingen in gebieden met gescheiden riolering) het oppervlaktewater bereikt. Een fractie van ABR in mest belandt vanuit de bodem door afspoeling en uitspoeling in het grondwater en het oppervlaktewater. Voor de menselijke blootstelling aan ABR in het milieu is deze fractie belangrijk. Het is niet aan te geven hoe groot deze fractie precies is, vanwege de complexe processen die bij uitspoeling een rol spelen, zoals inactivatie van bacteriën, hechting van bacteriën aan bodemdeeltjes en rol van neerslag voor de uitspoeling. Toch is aan te nemen dat de bijdrage van humane bronnen aan het voorkomen van ABR in oppervlaktewater waarschijnlijk beduidend groter is dan de bijdrage van mest.

Conclusies

1. Dierlijke mest bevat ook na opslag op de boerderij zowel ESBL-EC alsook resistentiegenen en residuen van antibiotica. Mest is daarmee een bron van waaruit ABR in het Nederlandse milieu terecht kan komen. De prevalenties en concentraties van ESBL-EC, resistentiegenen en residuen hangen af van de mestsoort, maar tonen ook binnen een mestsoort grote variaties.
2. Alle verschillende mestsoorten dragen bij aan de totale vrachten aan resistente bacteriën, resistentiegenen en antibiotica die op landbouwgrond terecht komen. Er is geen mestsoort die het gros van de emissies van zowel ESBL-EC, alsook van resistentiegenen en residuen van antibiotica veroorzaakt.
3. De totale vracht aan ABR die met mest Nederlandse landbouwgrond bereikt is vergelijkbaar met de totale vracht die met afvalwater het oppervlaktewater bereikt. Voor de humane blootstelling is ABR in oppervlaktewater van grotere relevantie

dan ABR op landbouwgrond. De totale vracht die vanuit mest in het oppervlaktewater terechtkomt, is waarschijnlijk beduidend kleiner dan de vracht vanuit afvalwater.

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Wereldwijd worden op steeds grotere schaal infecties met bacteriën gesignaleerd die resistent zijn voor antibiotica. Het landelijke programma 'aanpak van antibioticaresistentie' richt zich op alle domeinen in welk antibioticaresistente bacteriën kunnen voorkomen: in de gezondheidszorg, bij dieren, in voedsel en in het milieu (One Health benadering).

De belangrijkste bronnen en routes waarlangs resistente bacteriën en antibioticaresten het milieu bereiken zijn via mest en afvalwater. Met deze stromen bereiken ook antibioticaresistentiegenen en residuen van antibiotica het milieu. Het voorkomen van resistente bacteriën in het milieu werd in Nederland nog niet systematisch onderzocht. Daarom werden in een eerder project nulmetingen van het voorkomen van antibioticaresistentie in humaan afvalwater verricht (Schmitt et al. 2017a). De invloed van bemesting met dierlijke mest op het voorkomen van resistente bacteriën in het milieu werd in deze eerdere studie alleen in een pilot onderzocht. Dit rapport heeft tot doel structurele metingen ("nulmetingen") uit te voeren van de concentraties van resistente bacteriën, residuen van antibiotica en resistentiegenen in dierlijke mest en de emissies naar het milieu te kwantificeren.

1.2 Doel

Doel van dit project is om de concentraties van antibioticumresistente bacteriën, antibioticaresistentiegenen en residuen van antibiotica in mest van landbouwhuisdieren te bepalen (nulmetingen), en de totale stromen te kwantificeren die met dierlijke mest het milieu bereiken.

1.3 Aanpak

Metingen geven inzicht in welke mate ABR (resistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen) momenteel in dierlijke mest vóórkomen. De nulmetingen in deze studie werden uitgevoerd in mest van verschillende landbouwhuisdieren, en specifiek in mest na opslag op de boerderij, zoals gebruikt wordt voor bemesting van landbouwgrond. In combinatie met de totale hoeveelheden mest kunnen deze resultaten geëxtrapoleerd worden naar schattingen over de totale hoeveelheden ABR die jaarlijks met mest op het milieu worden geloosd. Deze kunnen vervolgens vergeleken worden met de totale hoeveelheden die met menselijk afvalwater het milieu bereiken.

De resistente bacteriën, resistentiegenen en antibioticaresiduen verspreiden zich, nadat de mest is uitgereden over het land, naar de bodem, het grondwater en naar oppervlaktewater. Daarnaast kunnen ze worden afgebroken of geïnactiveerd worden. Voor de humane blootstelling zijn vooral de emissies naar het oppervlaktewater relevant. Daarom wordt de stand van de literatuur betreffende de afspoeling van bacteriën vanuit mest naar oppervlaktewater beschreven.

1.4 Achtergrond

1.4.1 *Antibioticaresistentie in mest*

Het gebruik van antibiotica in de veeteelt daalt sinds 2010, het jaar waarin concrete doelen voor de reductie van het antibioticagebruik in de veehouderij vastgesteld werden. Ten opzichte van 2009 is het totale gebruik in de vier grote diersectoren inmiddels (2017) met 38-72% afgenomen, en ook het specifieke gebruik van derde keuze middelen is gereduceerd.

Na behandeling van dieren met antibiotica worden meestal meer dan 10% en voor sommige antibiotica tot 90% van de toegediende hoeveelheden uitgescheiden. De concentraties van antibiotica in dierlijke mest kunnen voor enkele antibiotica (sulfonamiden en tetracyclinen) in de orde van grootte van mg/kg liggen (Heuer et al. 2011, Masse et al. 2014). Dit geldt ook voor Nederlandse fecesmonsters, zoals in monsters van kalveren en varkens (Berendsen et al. 2015). Andere antibiotica, zoals beta lactams en macroliden, zijn relatief snel afbreekbaar tijdens mestopslag (Schmitt et al. 2017b).

Terwijl het voorkomen van bijzonder resistente micro-organismen (BRMO) in dierlijke feces incidenteel wordt onderzocht, bleek uit een in 2014 uitgevoerde kennissynthese (Huijbers et al. 2015) dat er geen literatuur beschikbaar was over de aanwezigheid en concentraties van ABR in mest op het moment dat het uitgereden wordt over land.

Het voorkomen van antibioticaresistentiegenen in dierlijke feces en dierlijke mest is relatief goed onderzocht, voor een deel ook in mest op het moment van uitrijden. Ook werd herhaaldelijk gevonden dat bemesting tot een (tijdelijke) verhoging van het niveau van resistentiegenen in bemeste gronden leidt (Chee-Sanford et al. 2009, Heuer et al. 2011, Xie et al. 2018).

2 Methoden

2.1 Monstername

De monstername was gericht op dierlijke mest van verschillende diersoorten zoals gebruikt voor verwerking of bemesting van landbouwgrond, dus na opslag op de producerende veehouderijen. De monstername werd daartoe uitgevoerd bij mestverwerkingsinstallaties direct na aanvoer van de mest. De monsters werden gekoeld bewaard en naar het laboratorium getransporteerd en binnen 24 uur geanalyseerd.

De samenstelling van de monsters is weergegeven in Tabel 1.

Tabel 1. Mestmonsters genomen in 2017.

Diersoort	Aantal
Leghennen	12
Kuikens	10
Kalveren – wit	10
Kalveren – rose	10
Rundvee	14
Zeugen	20
Totaal	76

Voor de analyses van de vrachten van ESBL-EC in mest en voor de analyse van residuen werden de hier verkregen resultaten gecombineerd met resultaten van vergelijkbare mestmonsters onderzocht in 2013/2014 en 2016 (Schmitt et al. 2017). De reden daarvoor is dat het aantal monsters van een specifieke diersoort in de meeste gevallen klein is, wat tot onzekerheden in de schattingen van prevalenties van resistente bacteriën leidt.

De concentraties van resistentiegenen en antibioticaresiduen werden in de monsters genoemd in Tabel 1 bepaald, en ook in 24 monsters die in 2016 genomen werden (Schmitt et al. 2017).

2.2 Analyse van ESBL-EC en *E. coli* in mest

Drijfmest monsters werden 1:1 verdund in gebufferd pepton water (BPW) in een filterzak en vervolgens gehomogeniseerd met behulp van een Pulsifier®. Droge mest werd 1:1 of 1:2 keer verdund met BPW in een potje (afhankelijk van hoe droog het was), en gemengd met behulp van een steriele lepel. Vervolgens werd hiervan een 10x verdunning gemaakt in een filterzak in BPW, en werd dit gehomogeniseerd met behulp van een Pulsifier®. Van de gehomogeniseerde mest werd vervolgens een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt in pepton-fysiologisch zout (PFZ). Hiervan werd 100 µl van een 10⁻¹ tot 10⁻⁴ verdunning uitgespateld op 'tryptone bile X-glucuronide' (TBX) agar voor de isolatie van *E. coli*, en 100 µl en 1 ml (in drie porties van 333 µl) van de 1:1 (drijfmest) of 10⁻¹ (droge mest) verdunning op ChromID® ESBL agar voor de isolatie van ESBL-EC en op TBX agar aangevuld met

1 µg/ml cefotaxime (CTX) voor de isolatie van AmpC en ESBL-EC. Tenslotte werd 20g gehomogeniseerde mest (drijfmest) of 10 g pure droge mest opgenomen in BPW aangevuld met 1 µg/ml CTX voor ophoping van ESBL-en AmpC producerende *E. coli*. Kweken werden 4 uur bebroed bij 37°C gevolgd door 18-24 uur bij 44°C. Daarna werden de verdachte kolonies geteld voor het bepalen van de concentraties. Als de 'directe' kweken negatief waren (detectiegrens 1,8 kve/g voor drijfmest en 10,5 kve/g voor droge mest) werden de ophopingen afgeënt op TBX/CTX en ESBL-chromID, en 18-24 uur gekweekt bij 37°C. Indien monsters negatief waren in de directe kweek maar positief in de ophoping wil dat zeggen dat de hoeveelheid bacteriën < 1,8 of 10,5 kve/g was, maar meer dan 0,1 kve/g. Omdat ESBL-EC op zowel TBX/CTX platen alsook op ChromID brilliance platen worden gevonden en omdat TBX/CTX platen ernaast ook AmpC-producerende *E.coli* aantonen, werd het maximum van de gemeten concentraties op TBX/CTX en ChromID ESBL platen als concentratie van ESBL/AmpC in het monster gedefinieerd.

De gegevens werden aangevuld met data zoals gerapporteerd in (Schmitt et al. 2017). In 2016 werd dezelfde methode gebruikt als hier gerapporteerd, in 2013/2014 werd een vergelijkbare methode gebruikt maar werd in plaats van TBX/CTX agar BECSA/TBX agar gebruikt.

Tellingen en monstervolumes van de analyse op *E. coli* en ESBL-EC werden in Mathematica (versie 11.1.0.0, Wolfram Inc, Champaign, Illinois) ingelezen en bewerkt. De ESBL analyses omvatten twee experimentele methodes (gebaseerd op ESBL Brilliance platen; of op platen met toevoeging van cefotaxime). De hoogste telling van ESBL-EC op een van de twee soorten platen werd als telling van ESBL-EC gebruikt.

Als in een monster van 2016 of 2017 geen ESBL-EC werd gedetecteerd, bedroeg het monstervolume dat van de plaattelling en de ophoping tezamen. Indien de ophoping ESBL-EC positief was maar niet de directe tellingen, werd aangenomen dat er 1 kolonievormende eenheid in het monstervolume zat (dit is een onderschatting van de echte concentratie).

De volgende berekeningen werden per mestcategorie (melkvee, kalveren, varkens, leghennen en kuikens) uitgevoerd:

1. Het aantal monsters werd geteld.
2. Het percentage positieve monsters werd berekend uit het aantal ESBL-EC positieve monsters gedeeld door het aantal *E. coli* positieve monsters en vermenigvuldigd met een factor honderd.
3. Rekenkundig en geometrische gemiddelde, de mediane en maximale concentraties werden berekend uit de concentraties per monster (telling gedeeld door volume).
4. Aangenomen dat de bacteriën per monster-suspensie homogeen verdeeld zijn, zijn de concentraties tussen monsters met volumes $V_1 \dots V_N$ Gammaverdeeld met parameter r en λ en de bacterietellingen negatief binomiaal verdeeld met parameters r en $1/(1+\lambda V_i)$ (Teunis et al. 2009). Schattingen van de waarden voor r en λ staan gedetailleerd beschreven in (Schijven et al. 2014, Schijven et al. 2011). Het product $r\lambda$ is de gemiddelde waarde van de Gammaverdeling en komt ongeveer overeen met

het rekenkundig gemiddelde. Op basis van de Gammaverdeelde concentraties werden ook 5-percentielen en 95-percentielen berekend.

5. Op basis van paarsgewijze ratio's van de concentraties van ESBL-EC en *E. coli* werd een betaverdeling met parameters α en β gefit (EstimatedDistribution), waarvan een gemiddelde ratio en de 95-percentielwaarde werden afgeleid.

2.3 Analyse van resistentiegenen in mest

Mestmonsters werden opgeslagen bij -20°C. Voor DNA extractie werd gebruikt gemaakt van een gemodificeerd protocol gebaseerd op het QIAamp Fast DNA 96 stool mini kit protocol (Qiagen, cat. no. 51604), aangevuld met een bead beating stap, zoals beschreven in (Knudsen et al. 2016). De DNA werd voor qPCR 100x verdund. qPCR vond plaats op de genen *ermB* (macrolide resistentie) en *sul1* (sulfonamide resistentie). De gebruikte primers en reacties zijn samengevat in Tabel 2 en Tabel 3. De reacties werden uitgevoerd met IQSybrgreen mastermix (Biorad) onder toevoeging van BSA tot een concentratie van 0.4 ug/ul, en met gebruik van 2 ul DNA template. Als calibratiecurves werden synthetische DNA standarden gebruikt.

Tabel 2. Primer sequenties van de gebruikte qPCR reacties.

Gen	Referentie	Naam	Sequentie
<i>ermB</i>	Knapp et al., 2010	ErmB-F	AAACTTACCCGCCATACCA
		ErmB-R	TTTGGCGTGTTCATTGCTT
<i>sul1</i>	Pei et al., 2006	Sul1-F	CGCACCGGAAACATCGCTGCAC
		Sul1-R	TGAAGTTCCGCCCAAGGCTCG

Tabel 3. qPCR reactie parameter.

Gen	Primer concentratie in reactie	Reactievolumen	Amplificatieprotocol
<i>ermB</i>	400 nM	10 ul	95°C 5 min 40x(95°C 15s 61°C 30s) + melting curve 65°C-95°C 0.5/5s
<i>sul1</i>	400 nM	10 ul	95°C 5 min 40x(95°C 15s 61°C 30s) + melting curve 65°C-95°C 0.5/5s

2.4 Analyse van residuen van antibiotica in mest

Deze analyses vonden plaats bij Wageningen Food Safety Research (WFSR, voorheen RIKILT). De gedetailleerde methoden zijn opgenomen in Annex 5.1. In het kort werd per monster een extractie uitgevoerd. Per monster werd een parallelmonster met referentiestoffen gespiked, ter controle van de analyse. In de extracten werden de concentraties antibiotica door middel van LC-MS/MS bepaald. Voor monsters genomen in 2016 werden ook antibiotica uit de aminoglycosiden-groep onderzocht, deze zijn niet onderzocht in de monsters genomen in 2017.

2.5 Berekenen van vrachten

Uit de gemiddelde concentraties van *E. coli* en ESBL-EC, alsmede hun 95-percentielwaarden, werden per diersoort de vrachten of te wel jaaremissies berekend. De jaaremissie is het product van concentratie (aantal bacteriën per g of ml mest) en de jaarlijks geproduceerde mest (orde van groottes van 10^{12} g = megaton) voor mest gebruikt op het eigen bedrijf, en op andere grond in Nederland. De mestproducties werden ontleend aan (van Leuken et al. 2017).

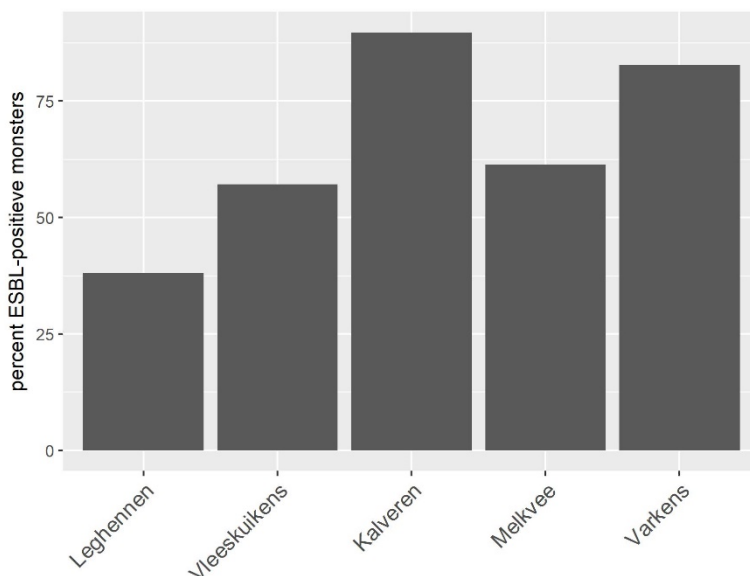
3 Resultaten

3.1 Prevalentie en concentraties van ESBL-EC en *E. coli* in mest

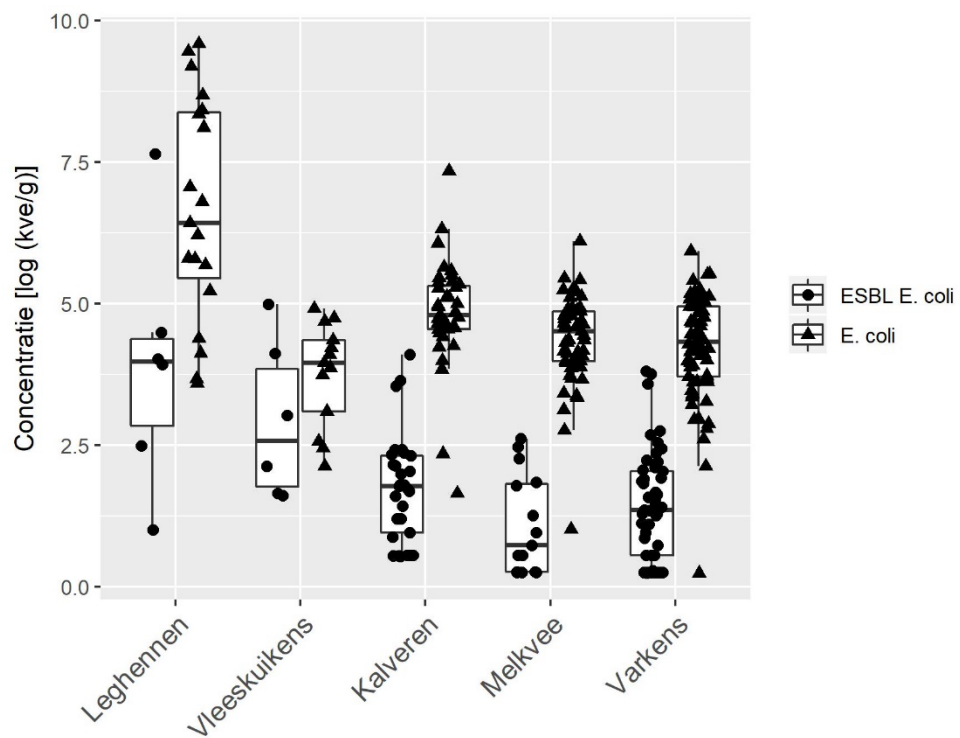
In nagenoeg alle monsters werden *E. coli* aangetroffen (in de meetseries van 2017 werd in een legghenmonster geen *E. coli* gedetecteerd, in de eerdere jaren in een legghenmonster en een kuikenmonster). Indien geen *E. coli* kan worden aangetoond, wordt ervan uitgegaan dat het monster niet valide is.

De prevalentie en de concentraties van ESBL-EC is voor alle drie meetcampagnes samen en voor de monsters genomen in 2016 en 2017 weergegeven in *Tabel 4*. De aantallen monsters per diersoort en meetcampagne zijn meestal te laag om uitspraken te doen over een afname of toename van de prevalenties of concentraties van ESBL-EC in de tijd, of te wel tussen de meetcampagnes. De analyse focust zich daarom op de data als een geheel, wat inhoudt dat mogelijke veranderingen in de tijd (zoals door reductie van het gebruik van cephalosporines in de laatste jaren) hier niet beschouwd kunnen worden.

De concentraties toonden grote variatie binnen een mestsoort. Er zijn duidelijke verschillen tussen de diersoorten: de hoogste prevalenties worden gevonden in varkens en kalveren (*Figuur 1*), terwijl de hoogste concentraties aan ESBL-EC (en *E. coli*) in ESBL-positieve monsters in pluimvee (zowel legghennen alsook vleeskuikens) gevonden worden, en de laagste concentraties in melkvee (*Figuur 2*).



Figuur 1. Percent ESBL-EC positieve mestmonsters per diersoort (gegevens van 3 meetcampagnes tussen 2013 en 2017 samengevat).



Figuur 2. Concentraties van ESBL-producerende E. coli en E. coli in diverse soorten mestmonsters. Alleen concentraties in positieve monsters zijn getoond.

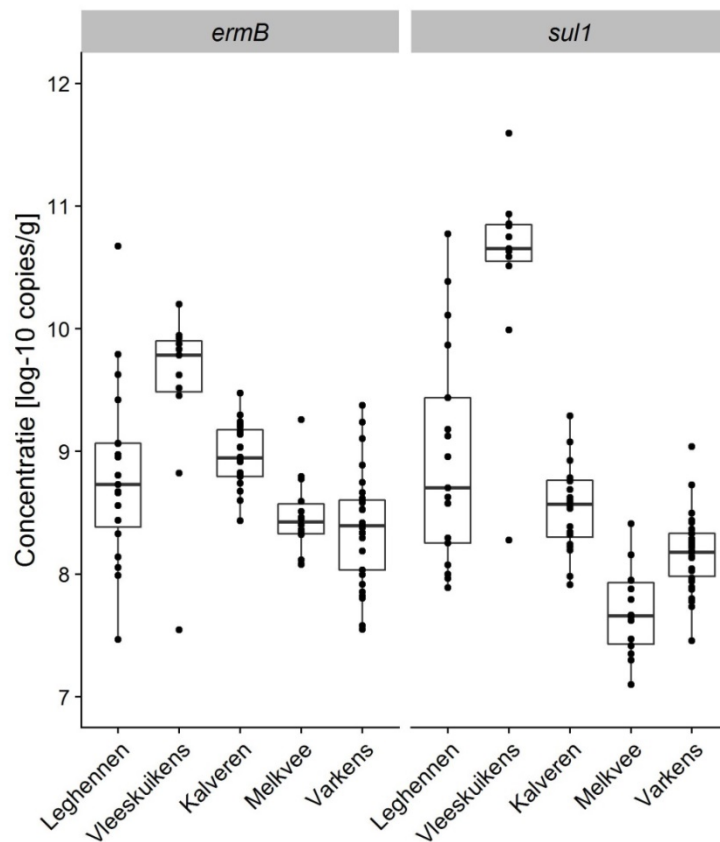
Tabel 4. Prevalentie en concentratie van ESBL-producerende E. coli in mestmonsters genomen tussen 2013 en 2017. Het gemiddelde geeft bij benadering het gemiddelde van alle monsters aan, dus inclusief de ESBL-EC negatieve monsters. De mediaan is de mediaan van de ESBL-EC positieve monsters. Alle concentraties zijn aangegeven in kve/g mest. Het totale aantal monsters over alle jaren bedroeg 201.

Meet-campagne	Diersoort	n	E. coli positief	ESBL-EC positief (%)	ESBL-EC - Gemiddelde (rλ)	ESBL-EC - Mediaan	ESBL-EC - max
alle jaren	Leghennen	21	19	42	3100	9520	37000
alle jaren	Vleeskuikens	14	13	61	8100	610	98000
alle jaren	Kalveren	39	39	90	530	60	12800
alle jaren	Melkvee – vloeibaar	55	55	64	20	5,4	423
alle jaren	Melkvee – droog	2	2	0	Nvt	nvt	Nvt
alle jaren	Varkens	70	70	83	280	23	6500
2016/2017	Leghennen	18	16	38	1200	4395	10560
2016/2017	Vleeskuikens	12	11	55	420	4980	13500
2016/2017	Kalveren	25	25	96	610	40	12800
2016/2017	Melkvee - vloeibaar	14	14	93	32	5,5	299
2016/2017	Melkvee - vast	2	2	0	nvt	nvt	Nvt
2016/2017	Varkens	30	30	90	570	23	6500

3.2

Prevalentie en concentraties van resistentiegenen in mest

In 94 mestmonsters genomen in 2016 en 2017 werden de resistentiegenen *ermB* en *sul1* onderzocht. Deze werden in alle mestmonsters (behalve dan twee monsters van leghennenmest) gevonden. De concentraties verschilden tussen de diersoorten. Ook werd een grote spreiding in de concentraties binnen de mestsoorten gevonden. De hoogste concentraties van *ermB* en *sul1* werden in mest van vleeskuikens gevonden (*Figuur 3, Tabel 5*).



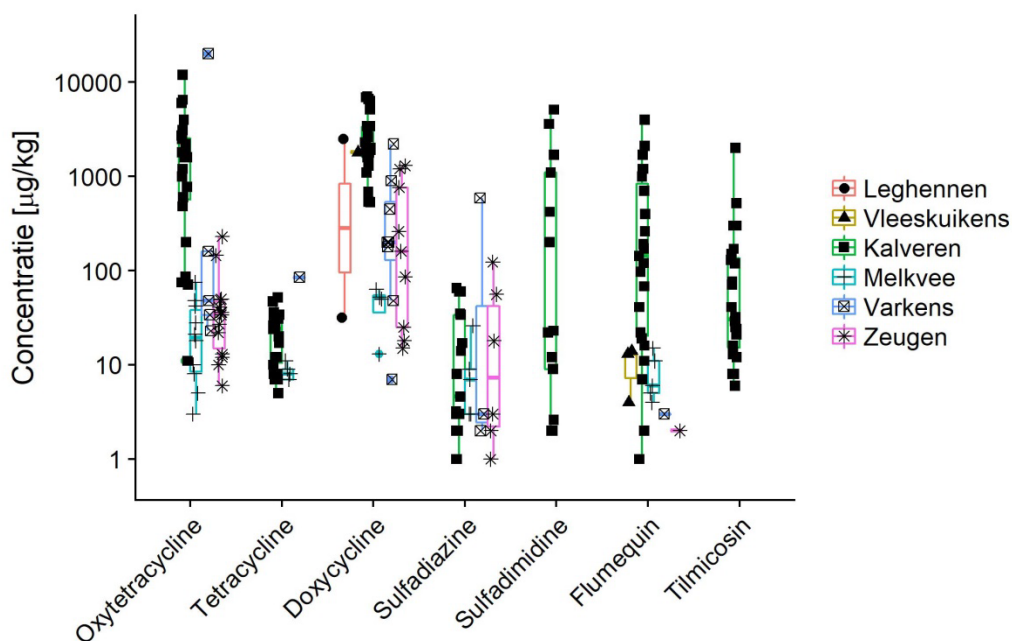
Figuur 3. Concentraties van de antibioticaresistentiegenen *ermB* en *sul1* in diverse soorten mestmonsters.

Tabel 5. Prevalentie en concentratie van de resistentiegenen *sul1* en *ermB* in mestmonsters, in $\log_{10}$ kopieën per g mest. Mestsoorten met dezelfde letter in de kolom 'significantie' verschillen statistisch niet significant van elkaar, mestsoorten met een andere letter wel.

Diersoort	gen	N	% positieve monsters	Gemiddelde	Mediaan	Min	Max	Significantie
Leghennen	<i>ermB</i>	19	100	8,8	8,7	7,5	10,7	d
Vleeskuiken	<i>ermB</i>	11	100	9,5	9,8	7,5	10,2	bc
Kalveren	<i>ermB</i>	20	100	9,0	8,9	8,4	9,5	b
Melkvee	<i>ermB</i>	14	100	8,5	8,4	8,1	9,3	a
Varkens	<i>ermB</i>	30	100	8,4	8,4	7,5	9,4	ac
Leghennen	<i>sul1</i>	19	89	9,0	8,7	7,9	10,8	ac
Vleeskuiken	<i>sul1</i>	11	100	10,5	10,7	8,3	11,6	a
Kalveren	<i>sul1</i>	20	100	8,5	8,6	7,9	9,3	bc
Melkvee	<i>sul1</i>	14	100	7,7	7,7	7,1	8,4	d
Varkens	<i>sul1</i>	30	100	8,2	8,2	7,5	9,0	d

3.3 Prevalentie en concentraties van antibiotica in mest

In 100 mestmonsters genomen in 2016 en 2017 werden antibiotica bepaald. Enkele antibiotica werden in veel monsters aangetroffen, waaronder tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline en doxycycline), sulfonamides (sulfadiazine en sulfadimidine) en macroliden (tilmicosin, in kalveren) (Figuur 3, Tabel 5). Ook het fluorochinoloon flumequin werd relatief vaak gevonden (50% positieve varkensmestmonsters en 92% positieve kalverenmestmonsters). De concentraties varieerden sterk binnen een mestsoort en ook tussen de mestsoorten. De meeste positieve monsters en de hoogste concentraties werden in mest van kalveren gevonden. In melkvee en varkens werden vooral tetracyclinen gevonden. In pluimvee was het aantal positieve monsters het laagst. Beta lactam antibiotica werden niet onderzocht, omdat deze naar verwachting beneden de detectielimiet liggen, aangezien deze groep antibiotica onstabiel zijn in mest.



Figuur 4. Concentraties van antibioticaresiduen in mestmonsters van verschillende diersoorten.

Tabel 6. Prevalentie en concentratie van residuen van antibiotica in mestmonsters, in µg per g mest. Het totale aantal onderzochte monsters was 100. Het gemiddelde, de median, min en max is berekend over alle monsters met waarnemingen boven het detectielimiet. Het detectielimiet verschilt per monster en is als bandbreedte aangegeven.

Diersoort	Antibioticum	n	% positieve monsters	Gemiddelde	Mediaan	Min	Max	Detectielimiet
Leg-hennen	Doxycycline	19	11	1266	1266	32	2500	3-40
	Tylosine	19	5	400	400			1-30
	Spiramycin	19	11	27	27	16	38	1-40
Vleeskuiken	Tildipirosin	19	5	47	47			1-100
	Dihydrostrep-tomycine	19	5	1	1			1-20
	Doxycycline	12	8	1800	1800			3-40
	Sulfametho-xazole	12	17	355	355	190	520	1-10
	Trimethoprim	12	25	528	650	23	910	1-40
	Ciprofloxacin	12	8	270	270			1-80
	Enrofloxacin	12	8	1500	1500			1-60
	Flumequin	12	25	10	13	4	14	1-5
	Spiramycin	12	8	7	7	7	7	1-40
	Lincomycin	12	17	164.5	164.5	49	280	1-20
Kalveren	Dihydrostreptomycine	12	8	1	1	1	1	1-20
	Oxytetracycline	25	96	2254	1700	11	12000	1-40
	Chloortetracycline	25	4	61	61			10-40
	Tetracycline	25	88	23	24	5	52	2-70
	Doxycycline	25	100	2806	2000	530	7000	3-40
	Sulfadiazine	25	68	19	4.6	1	65	1-2
	Sulfadimidine	25	52	938	23	2	5100	1-3
	Sulfamethoxazole	25	12	3.7	3	1	7	1-10
	Marbofloxacin	25	4	19	19			1-15
	Ciprofloxacin	25	44	3	2	1	9	1-80
	Enrofloxacin	25	12	3	3	3	4	1-60
	Flumequin	25	92	586	143	1	4000	1-5
	Tylosine	25	12	7.7	5	4	14	1-30
	Tulathromycin	25	8	19.5	19.5	18	21	3-80
	Tilmicosin	25	96	171	30.5	6	2000	3-40
	Dihydrostrep-tomycine	25	20	1	1	1	1	1-20
	Gentamicine	25	12	1	1	1	1	1-20

Diersoort	Antibioticum	n	% positieve monsters	Gemid- delde	Me- diaan	Min	Max	Detectie- limiet
Melkvee	Neomycine	25	20	122	70	15	380	50-100
	Oxytetracyclin	14	71	26	19.5	3	75	1-40
	Tetracycline	14	36	8	8	7	11	2-70
	Doxycycline	14	29	45	51	13	63	3-40
	Sulfadiazine	14	36	10	7	3	26	1-2
	Ciprofloxacin	14	14	6.5	6.5	4	9	1-80
	Flumequin	14	36	8	6	4	15	1-5
Varkens	Lincomycin	14	14	2	2	2	2	1-20
	Oxytetracyclin	9	56	4053	48	23	20000	1-40
	Tetracycline	9	11	85	85			2-70
	Doxycycline	9	89	523	200	7	2200	3-40
	Sulfadiazine	9	33	198	3	2	590	1-2
	Sulfadoxine	9	11	1	1			1-10
	Trimethoprim	9	11	100	100	100	100	1-40
	Flumequin	9	22	3	3	3	3	1-5
	Tildipirosin	9	11	26	26			1-100
	Dihydrostrep- tomycine	9	56	1	1	1	1	1-20
Zeugen	Neomycine	9	11	1	1			50-100
	Oxytetracyclin	21	67	51	35	6	230	1-40
	Doxycycline	21	43	425	160	15	1300	3-40
	Sulfadiazine	21	29	34	10.5	1	123	1-2
	Sulfadoxine	21	10	2.5	2.5	2	3	1-10
	Ciprofloxacin	21	10	4	4	4	4	1-80
	Flumequin	21	5	2	2			1-5
	Dihydrostrep- tomycine	21	24	1	1	1	1	1-20
	Gentamicine	21	5	1	1			1-20
	Neomycine	21	19	25	25	1	49	50-100

3.4 Vrachten van ABR in mest

3.4.1 Emissies van ESBL-EC met mest naar landbouwgrond

Uit de concentraties van *E. coli* en ESBL-EC werden jaaremissies berekend. De jaaremissie is het product van de bacteriënconcentratie en de jaarlijks geproduceerde mest voor mest gebruikt op het eigen bedrijf, en op andere grond in Nederland. De mestproducties werden ontleend aan (van Leuken et al. 2017). De mestproductie varieert per diersoort, en loopt uiteen tussen 0,15 en 45 megaton per jaar. De emissies van ESBL-EC liggen voor vleeskuikens, kalveren, en melkvee rond 10^{15} kve/jaar (*Tabel 7*), voor vleeskuikens iets lager en voor varkens en zeugen iets hoger. Door relatief grote verschillen tussen de ESBL-EC concentraties per monster is de spreiding van deze schattingen groot – het 95% percentiel ligt ongeveer een factor 10 hoger dan het gemiddelde.

Tabel 7. Vrachten van ESBL-producerende *E. coli* die met mest op het land worden uitgebracht. De vrachten worden aangegeven in kve/jaar, en de gemiddelde schattingen en het 95% percentiel van de schattingen is weergegeven.

Diersoort	Mestproductie [10 ⁶ m ³ /jaar]	ESBL-EC vracht [kve / jaar], gemiddeld	ESBL-EC vracht [kve / jaar], 95% percentiel
Leghennen	0,15	5*10 ¹⁴	2*10 ¹⁵
Vleeskuikens	0,15	1*10 ¹⁵	7*10 ¹⁵
Kalveren	3,9	2*10 ¹⁵	1*10 ¹⁶
Melkvee	44,9	9*10 ¹⁴	5*10 ¹⁵
Varkens+zeugen	9,7	3*10 ¹⁵	1*10 ¹⁶

3.4.2

Emissies van resistentiegenen met mest naar landbouwgrond

Uit de concentraties van de resistentiegenen werden zoals onder 3.4.1 jaaremissies berekend. De emissies van resistentiegenen liggen voor kalveren, melkvee en varkens en zeugen rond 10¹⁸-10¹⁹ kopieën/jaar (Tabel 8), voor leghennen iets lager. De spreiding van deze schattingen is groot – het 95% percentiel ligt voor de enkele diersoorten tot ongeveer een factor 10 hoger dan het gemiddelde, en voor de totale emissie vanuit alle diersoorten ongeveer een factor 5 hoger. Melkvee heeft de grootste bijdrage aan de *ermB* emissies, terwijl vleeskuikens de grootste bijdrage aan de emissies van *sul1* hebben.

Tabel 8. Vrachten van resistentiegenen die met mest op het land worden uitgebracht. De vrachten worden aangegeven in kopieën/jaar, en de schattingen gebaseerd op het geometrisch gemiddelde van de concentraties en het 95% percentiel van de schattingen is weergegeven. Voor zeugen zijn de concentraties zoals gemeten in varkens aangenomen.

Diersoort	Mestpro- ductie [10 ⁶ m ³ /jaar]	<i>ermB</i> vracht [kve / jaar], gemiddeld	<i>ermB</i> vracht [kve / jaar], 95% percentiel	<i>sul1</i> vracht [kve / jaar], gemiddeld	<i>sul1</i> vracht [kve / jaar], 95% percentiel
Leghennen	0,15	9*10 ¹⁶	1*10 ¹⁸	2*10 ¹⁷	5*10 ¹⁸
Vleeskuikens	0,15	5*10 ¹⁷	2*10 ¹⁸	5*10 ¹⁸	3*10 ¹⁹
Kalveren	3,9	4*10 ¹⁸	8*10 ¹⁸	1*10 ¹⁸	5*10 ¹⁸
Melkvee	44,9	1*10 ¹⁹	4*10 ¹⁹	2*10 ¹⁸	7*10 ¹⁸
Varkens+ zeugen	9,7	1*10 ¹⁸	8*10 ¹⁸	8*10 ¹⁷	2*10 ¹⁸

3.4.3

Emissies van antibiotica met mest naar landbouwgrond

Zoals beschreven in 3.3 werden de meeste antibiotica maar in een fractie van de onderzochte monsters gevonden. Het totale aantal onderzochte monsters (n=100) was daarnaast lager dan voor de concentraties van ESBL-EC (n=201), omdat de monsters genomen in 2013 en 2014 niet op antibiotica werden geanalyseerd. Daarom werd de meetonzekerheid te groot geacht om jaaremissies van antibiotica met mest te schatten. Meer onderzoek is nodig om hier een inschatting van te maken.

3.4.4 *Afspoeling van bacteriën en resistentiegenen van landbouwgrond naar oppervlaktewater*

De totale vrachten van ESBL-EC en van resistentiegenen geven de hoeveelheid ABR aan die via mest het Nederlandse milieu bereikt. Deze vrachten kunnen vervolgens worden vergeleken met de vrachten die vanuit humane ontlasting met afvalwater het oppervlaktewater en daarmee het Nederlandse milieu bereiken.

Landbouwgrond en oppervlaktewater zijn echter niet direct te vergelijken wat betreft de menselijke blootstelling aan ABR. In het algemeen zijn de volgende routes van humane blootstelling aan ABR in het milieu mogelijk:

- Via zwemmen in officiële zwemwaterlocaties die beïnvloedt zijn door humaan afvalwater of afspoeling van bemeste akkers of graslanden;
- Via contact met oppervlaktewater in niet-officiële zwemwaterlocaties (tijdens kanoën of andere vormen van recreatie of andersoortig contact), die beïnvloedt zijn door humaan afvalwater of afspoeling van bemeste akkers of graslanden;
- Via aerosolisatie van bacteriën en opname door inhalatie in nabijheid van bemeste landbouwgronden.

Het milieu kan daarnaast ook bij transmissie via voedsel een rol spelen, bijvoorbeeld via vlees, indien landbouwhuisdieren contact met oppervlaktewater hebben, of met groente, indien oppervlaktewater voor irrigatie wordt gebruikt.

Nagenoeg alle van deze routes lopen via oppervlaktewater, behalve dan aerosolisatie van bacteriën uit bemeste akkers. Daarom is niet alleen de totale emissie van ABR naar het milieu van belang, maar ook de hoeveelheid van ABR die via mest in oppervlaktewater terecht kan komen.

Op de schaal van Nederland is op dit moment nog geen goede inschatting mogelijk van het percentage resistente bacteriën die via mest in oppervlaktewater terechtkomt. De reden daarvoor is dat de afspoeling van bacteriën uit mest naar oppervlaktewater een complex proces is en sterk afhangt van lokale omstandigheden (Blaustein et al. 2015, Cho et al. 2016). Deze omstandigheden omvatten bijvoorbeeld de hoeveelheid regenval, het bodemtype, de helling van het terrein, de temperatuur, en de tijd tussen bemesting en afspoeling waarin inactivatie van de bacteriën op kan treden. Ook zijn er nagenoeg geen gegevens over resistente bacteriën beschikbaar, maar vooral over bacteriën van fecale oorsprong in het algemeen.

Om een indruk van de orde van grootte van de afspoeling van fecale bacteriën naar oppervlaktewater te krijgen, worden een aantal studies die deelaspecten van de keten van bemesting naar afspoeling naar oppervlaktewater onderzocht, beneden samengevat.

3.4.4.1 Vrijzetting van bacteriën uit mest en invloed van neerslag

In principe vindt vrijzetting van bacteriën uit mest pas plaats indien bemesting heeft plaatsgevonden en indien daarna neerslag valt. In een

metaanalyse van de beschikbare studies schat Blaustein et al. (2015) het percentage *E. coli* dat uit vloeibare mest vrijgezet kan worden. Dit is afhankelijk van de neerslag: Bij 20 mm neerslag is dat <1%, bij 60 mm neerslag werd 30% van de totale *E. coli* vrijgezet. In Nederland wordt op ongeveer 5 dagen in het jaar een neerslaghoeveelheid van 50 mm bereikt¹. Voor vaste mest was de hoeveelheid vrijgezette fecale bacteriën en *E. coli* minder afhankelijk van de neerslag en varieerde sterk tussen de studies (tussen 0.01% en ongeveer 50%). Voor koeienmest van weidedieren vonden Blaustein et al. (2015) en McDowell et al. (2006) een vrijzetting van enkele % van de *E. coli* in de mest tot 50 dagen na applicatie.

Zowel het uitrijden van mest alsook het neerslagpatroon toont pieken. Deze pieken kunnen tot een sterke variatie van de hoeveelheid afgespoelde fecale bacteriën in de tijd leiden.

3.4.4.2 Inactivatie van bacteriën

De inactivatie van fecale bacteriën wordt door de temperatuur en het bodemtype beïnvloedt. De gemiddelde inactivatie van commensale *E. coli* in bodem bij 15 graden is ongeveer 0.015 log kve/dag (Franz et al. 2014), in een maand wordt de concentratie van *E. coli* dus ongeveer met 0.45 log of te wel ongeveer 50% gereduceerd. De hoeveelheid uit mest vrijgezette bacteriën wordt dus lager naarmate droogte na de mestapplicatie langer duurt.

3.4.4.3 Mestapplicatie

Bij applicatie van mest onder de bodemoppervlakte, zoals bij mestinjectie zoals gebruikt in Nederland, is de vrijzetting van micro-organismen uit mest lager dan bij applicatie van mest op de bodem (Blaustein et al. 2015).

3.4.4.4 Observaties op stroomgebiedsschaal

De bovengenoemde data berusten op onderzoek op relatief kleine schaal (veldplots). Enkele recente studies uit Nederland en België geven inzicht in de bijdrage van verschillende bronnen van fecale bacteriën op de schaal van een rivier of stroomgebied. In het stroomgebied van de Schelde in België werd de contributie van landbouwgerelateerde bronnen van fecale indicatorbacteriën aan hand van metingen op ongeveer 1% van het totaal geschat (Ouattara et al. 2011) – modellering gaf een vergelijkbaar resultaat (Ouattara et al. 2013). Het merendeel van de fecale bacteriën werd door afvalwaterzuiveringsinstallaties uitgestoten en was daarmee van humane oorsprong. In een landelijk stroomgebied in Nederland werd gevonden dat de bijdrage van landbouw aan ESBL-EC en fecale indicatorbacteriën gemeten benedenstrooms de eerste afvalwaterzuivering in het stroomgebied zeer klein was (Blaak et al. 2018).

3.5 Vrachten van ABR – vergelijking van mest en humaan afvalwater

In eerder onderzoek werd bepaald hoeveel resistente bacteriën en resistentiegenen met afvalwater vanuit afvalwaterzuiveringsinstallaties (RWZI), vanuit overstorten en vanuit foutaansluitingen in wijken met

¹ <https://www.knmi.nl/kennis-en-datacentrum/achtergrond/hoe-vaak-komt-extreme-neerslag-zoals-op-28-juli-tegenwoordig-voor-en-is-dat-anders-dan-vroeger>

gescheiden riolering het oppervlaktewater kunnen bereiken (Blaak et al. 2018, Schmitt et al. 2017a). Bij gescheiden riolering wordt regenwater door gescheiden leidingsystemen naar het oppervlaktewater geleidt. Indien er, bijvoorbeeld na reparaties, fouten in de aansluitingen van de leidingen optreden, is het mogelijk dat het regenwater naar het riool wordt geleid en het ruwe afvalwater zonder zuivering direct naar het oppervlaktewater.

Deze schattingen werden gemaakt door de concentraties van ESBL-EC en van resistentiegenen in gezuiverd afvalwater van 100 RWZIs en in monsters van overstorten te bepalen en met het volumen van afvalwater de jaaremmissies te berekenen. De totale vracht aan ESBL-EC en aan resistentiegenen die met mest de bodem bereiken is, de onnauwkeurigheid van deze schattingen inachtnemend, nagenoeg identiek aan de vrachten die vanuit RWZIs, overstorten en wijken met gescheiden riolering het oppervlaktewater bereiken (*Tabel 9*).

Dit geldt echter waarschijnlijk niet voor de vrachten ESBL-EC die het Nederlandse oppervlaktewater bereiken. Het gedrag van ABR wijkt waarschijnlijk niet sterk af van het gedrag van fecale bacteriën in het algemeen, en ESBL-EC tonen waarschijnlijk hetzelfde gedrag als *E. coli*. Zoals in 3.4.4 beschreven, is de vracht van fecale bacteriën die vanuit mest naar het oppervlaktewater worden afgespoeld of uitgespoeld een fractie van de vracht van fecale bacteriën in de mest. Hoe groot deze fractie op nationale schaal is, is op dit moment niet in een algemeen richtcijfer aan te geven. Onder de meeste omstandigheden zal deze fractie waarschijnlijk kleiner zijn dan 10%. Afhankelijk van de ligging van het oppervlaktewater (met of zonder invloed van puntbronnen van afvalwater zoals RWZIs en overstorten) kan een bijdrage van humane bronnen überhaupt wel of niet mogelijk zijn. Ook hangt de invloed van mest op de aanwezigheid van ABR in het oppervlaktewater af van het tijdstip van uitrijden van mest en het neerslagpatroon (zie 3.4.4.1). Variaties in het neerslagpatroon kunnen daarom tot grote variaties in de vrachten leiden. Over het hele jaar genomen en op grotere schaal zullen humane bronnen de vrachten ABR in het oppervlaktewater waarschijnlijk domineren.

Tabel 9. Vrachten van ESBL-EC en resistentiegenen die in Nederland met mest op landbouwgrond worden uitgebracht, en die vanuit afvalwater het oppervlaktewater bereiken

Bron	ESBL-EC vracht [kve / jaar]	Bron	<i>ermB</i> vracht [kopieën / jaar]	<i>sul1</i> vracht [kopieën / jaar]	Bron
Mest totaal	$7 \cdot 10^{15}$	Deze studie	$2 \cdot 10^{19}$	$1 \cdot 10^{19}$	Deze studie
RWZI	$3 \cdot 10^{15}$	1)	$2 \cdot 10^{19}$	$2 \cdot 10^{20}$	1)
Overstorten	$1 \cdot 10^{15}$	2)	$3 \cdot 10^{17} - 9 \cdot 10^{19}$	$4 \cdot 10^{18} - 3 \cdot 10^{20}$	1)
Gescheiden riolering	$3 \cdot 10^{15}$	2)	$8 \cdot 10^{18}$	$3 \cdot 10^{19}$	1)

1): (Schmitt et al. 2017a), 2): (Blaak et al. 2018)

4 Discussie

Prevalentie en concentraties van ESBL-EC in mest

ESBL-EC werden in alle onderzochte mestsoorten gevonden. De prevalentie lag, afhankelijk van de mestsoort, tussen 42% en 90% en was het hoogst in kalverenmest en varkensmest.

In Nederland werd tot nu toe vooral de prevalentie van ESBL-EC in verse feces van dieren (genomen op het bedrijf of bij de slacht) onderzocht. De prevalenties in mest na opslag zijn niet direct te vergelijken met prevalenties zoals onderzocht in feces van enkele dieren of in mengmonsters van mest op het bedrijf, omdat de effecten van mestopslag en van homogenisering van de mest in de mestkelder op de prevalentie niet goed bekend zijn. Ook verschillen de gebruikte opwerkmethodes, wat tot verschillen in de gevoeligheid van de detectie van ESBL-EC kan leiden, en hadden de meeste studies een relatief kleine omvang.

De prevalentie van ESBL-EC op bedrijfsniveau is onder ander onderzocht voor melkvee en bedroeg in 2011 41% (Gonggrijp et al. 2016) en in een kleinere studie 2014-2015 40% (ESBLAT rapport, 2018). De hier gevonden prevalentie is iets hoger (64%). Ook de hier onderzochte kalverenmest had een hogere prevalentie (90%) dan in een retrospectieve studie op bedrijfsniveau tijdens 2006-2010 (10-39%, (Hordijk et al. 2013)). In contrast ermee is de hier gevonden prevalentie van vleeskuikens (61%) lager dan in studies uit 2013 en 2016 (100% en nagenoeg 100%, (ESBLAT rapport, 2018)), misschien veroorzaakt door de relatief droge condities tijdens opslag van vleeskuikenmest.

Er zijn zeer weinig gegevens over de concentraties van ESBL-EC in dierlijke mest beschikbaar. Hier werd de hoogste ESBL-EC concentratie gevonden in mest van leghennen, en de laagste concentratie in mest van melkvee. In mest van leghennen was ook de concentratie aan *E. coli* beduidend hoger dan in de andere mestsoorten. De ESBL-EC concentraties binnen een mestsoort tonen grote variaties.

Prevalentie en concentraties van antibioticaresiduen en resistentiegenen in mest

In mestmonsters werden vooral residuen van relatief persistente antibiotica gevonden, zoals tetracyclines, sulfonamides en fluorochinolonen. Dit stemt overeen met resultaten van metingen van residuen in feces van varkens en melkvee (Berendsen et al. 2015). De aanwezigheid van fluorochinolonen in 92% van de kalverenmestmonsters (maar ook in 20-30% van de mestmonsters van vleeskippen, varkens en melkvee) is hoger dan verwacht, aangezien deze derde keuze middelen in Nederland zeer beperkt ingezet worden (Stichting Diergeneesmiddelenautoriteit 2017).

De concentraties van de resistentiegenen *ermB* en *sul1* die in Nederlandse mestmonsters werden gevonden komen grofweg overeen met andere internationale metingen. Bijvoorbeeld vonden Garder et al. en Luby et al. (Garder et al. 2014, Luby et al. 2016) concentraties in

varkensmest in Iowa van 10^8 - 10^{12} kopieën per g en daarmee vergelijkbare concentraties als in Nederland. In Chinese (verse) mestmonsters werden de hoogste concentraties *ermB* en *sul1* in pluimveemest gevonden en de laagste in runderen (Mu et al. 2015), in overeenstemming met de hier gerapporteerde bevindingen.

Vrachten van ESBL-EC en resistentiegenen

De vrachten van ESBL-EC en resistentiegenen die met mest landbouwgrond bereiken werd berekend uit de mestproductie en uit de gevonden concentraties van ESBL-EC en resistentiegenen. Vrachten van antibioticaresiduen konden, vanwege de grote spreiding in gemeten concentraties en het grote aantal monsters waarin bepaalde antibioticaresiduen niet konden worden aangetoond, niet met voldoende betrouwbaarheid worden berekend.

Ondanks de grote verschillen in mestproductie per mestsoort dragen nagenoeg alle mestsoorten bij aan de totale vracht. Terwijl de hoogste aantallen ESBL-EC door uitbrengen van kalveren- en varkensmest het milieu bereiken, draagt mest van vleeskuikens en melkvee voornamelijk bij aan de emissies van de resistentiegenen *sul1* en *ermB*. Kalverenmest toont de hoogste prevalenties en concentraties aan antibioticaresiduen.

De totale vrachten die met mest het milieu bereiken zijn ongeveer even groot als de totale vrachten die met afvalwater het oppervlaktewater bereiken. Geen van deze beide bronnen is dus dominant.

De concentratie van ABR in oppervlaktewater is voor de menselijke blootstelling aan ABR waarschijnlijk belangrijker dan de emissies van ABR naar bemeste landbouwgrond, omdat de belangrijkste potentiële blootstellingsroutes via water verlopen (zoals zwemmen of watersport in officieel en niet-officieel zwemwater). De concentraties en vrachten van ABR in oppervlaktewater, die door afspoeling en uitspoeling van bemeste grond afkomstig zijn, zijn niet eenvoudig op een landelijke schaal te bepalen. In het algemeen zullen de ABR-vrachten die vanuit mest het oppervlaktewater bereiken echter substantieel lager zijn dan de vrachten die op de grond worden gebracht. Redenen daarvoor zijn onder andere de beperkte vrijzetting van bacteriën uit mest onder droge omstandigheden, en de inactivatie van microorganismen na uitrijden van mest, zo blijkt uit studies met niet-resistente bacteriën. Op een landelijke schaal zijn daarom emissies van ABR met afvalwater waarschijnlijk van groter belang voor de menselijke blootstelling dan emissies van ABR met mest.

Bij deze conclusies moet ook de onzekerheid van de vrachtenschattingen mee worden gewogen: Omdat het aantal monsters per mestsoort relatief laag is, en omdat er grote spreidingen in de concentraties van ESBL-EC en resistentiegenen binnen een mestsoort werden gevonden, hebben de schattingen van de vrachten een relatief grote meetonzekerheid.

5 Conclusies

1. Dierlijke mest bevat na opslag op de boerderij zowel ESBL-EC alsook resistentiegenen en residuen van antibiotica. Mest is daarmee een bron van waaruit ABR in het Nederlandse milieu terecht komt. De prevalenties en concentraties van ESBL-EC, resistentiegenen en residuen hangen af van de mestsoort, maar tonen ook binnen een mestsoort grote variaties.
2. Alle verschillende mestsoorten dragen bij aan de totale vrachten aan resistente bacteriën, resistentiegenen en antibiotica die op landbouwgrond terecht komen. Er is geen mestsoort die het gros van de emissies van zowel ESBL-EC, alsook van resistentiegenen en residuen van antibiotica veroorzaakt.
3. De totale vracht aan ABR die met mest Nederlandse landbouwgrond bereikt is vergelijkbaar met de totale vracht die met afvalwater het oppervlaktewater bereikt. Voor de humane blootstelling is ABR in oppervlaktewater van grotere relevantie dan ABR op landbouwgrond. De totale vracht die vanuit mest in het oppervlaktewater terechtkomt, is waarschijnlijk beduidend kleiner dan de vracht vanuit afvalwater.

6 Annex

6.1 Analyse van antibioticaresiduen

6.1.1 *Analysis of tetracyclines, sulfonamides, macrolides and quinolones*
Analysis of tetracyclines, sulfonamides, macrolides and quinolones were performed as in Berendsen 2015, with an extraction that was optimized during the course of the analyses (Jansen et al. 2019).

6.1.2 *Analysis of aminoglycosides*
Analysis of aminoglycosides was performed as in (Bello Gonzalez et al. 2015), with adaptations as summarized in the following paragraphs:

Sample pre-treatment

Two 2 gram portions of each sample of manure were weighed into separate 50 mL tubes, after which internal standards were added. To one of these portions aminoglycosides were added at a level of 100 µg/kg. Twenty mL of extraction liquid (10 mM KH₂PO₄ with 0.4 mM EDTA and 2% TCA) were added, samples were mixed by means of a vortex and shaken head-over-head for 30 min. The extract was centrifuged (15 min, 4600 g). The supernatant was brought to pH 7.6-7.9 and centrifuged (15 min, 4600 g). The complete extract was transferred to a conditioned CBX cartridge, followed by washing with 4 mL of water and drying. The aminoglycosides were eluted with 3 mL acetic acid (10% in MeOH). The eluate was dried at 60°C, evaporated under N₂ and taken up in 400 µL HFBA (0.065%).

LC-MS / MS

The following gradient was applied: 0-0.5 min, 0% B; 0.5-5 min, linear increase to 45% B; 5-8 min, linear increase to 60% B; 8-10 min, linear increase to 100% B. The injection volume was 40 µL. Detection was carried out by a Waters (Milford, MA, USA) Quattro Ultima mass spectrometer in positive electrospray ionization (ESI) mode. The parameters used were: capillary voltage, 2.7 kV; desolvation temperature, 500 ° C; source temperature, 120 ° C; cone gas, 150 L/h and desolvation gas 550 L/h.

- (2018) ESBL-Attributieanalyse. Mevius, D., Heederik, D. and van Duijkeren, E. (eds), De Stichting TKI Agri&Food (TKI).
- Bello Gonzalez, T.d.J., Zuidema, T., Bor, G., Smidt, H. and van Passel, M.W. (2015) Study of the Aminoglycoside Subsistence Phenotype of Bacteria Residing in the Gut of Humans and Zoo Animals. *Front Microbiol* 6, 1550.
- Berendsen, B.J.A., Wegh, R.S., Memelink, J., Zuidema, T. and Stolker, L.A.M. (2015) The analysis of animal faeces as a tool to monitor antibiotic usage. *Talanta* 132, 258-268.
- Blaak, H., Schilperoort, R. and Schmitt, H. (2018) Rol van afvalwater bij verspreiding antibioticaresistentie. Rioned, S.S. (ed), STOWA / Stichting Rioned.
- Blaustein, R.A., Pachepsky, Y.A., Shelton, D.R. and Hill, R.L. (2015) Release and Removal of Microorganisms from Land-Deposited Animal Waste and Animal Manures: A Review of Data and Models. *J Environ Qual* 44(5), 1338-1354.
- Chee-Sanford, J.C., Mackie, R.I., Koike, S., Krapac, I.G., Lin, Y.F., Yannarell, A.C., Maxwell, S. and Aminov, R.I. (2009) Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *J Environ Qual* 38(3), 1086-1108.
- Cho, K.H., Pachepsky, Y.A., Oliver, D.M., Muirhead, R.W., Park, Y., Quilliam, R.S. and Shelton, D.R. (2016) Modeling fate and transport of fecally-derived microorganisms at the watershed scale: State of the science and future opportunities. *Water Res* 100, 38-56.
- Franz, E., Schijven, J., de Roda Husman, A.M. and Blaak, H. (2014) Meta-regression analysis of commensal and pathogenic *Escherichia coli* survival in soil and water. *Environ Sci Technol* 48(12), 6763-6771.
- Garder, J.L., Moorman, T.B. and Soupier, M.L. (2014) Transport and persistence of tylosin-resistant enterococci, genes, and tylosin in soil and drainage water from fields receiving Swine manure. *J Environ Qual* 43(4), 1484-1493.
- Gonggrijp, M.a., Santman-Berends, I.M.G.A., Heuvelink, A.E., Buter, G.J., van Schaik, G., Hage, J.J. and Lam, T.J.G.M. (2016) Prevalence and risk factors for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing *Escherichia coli* in dairy farms. *Journal of Dairy Science* 99(11), 9001-9013.
- Heuer, H., Schmitt, H. and Smalla, K. (2011) Antibiotic resistance gene spread due to manure application on agricultural fields. *Curr Opin Microbiol* 14(3), 236-243.
- Hordijk, J., Wagenaar, J.A., van de Giessen, A., Dierikx, C., van Essen-Zandbergen, A., Veldman, K., Kant, A. and Mevius, D. (2013) Increasing prevalence and diversity of ESBL/AmpC-type beta-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from veal calves from 1997 to 2010. *J Antimicrob Chemother* 68(9), 1970-1973.
- Huijbers, P.M., Blaak, H., de Jong, M.C., Graat, E.A., Vandenbroucke-Grauls, C.M. and de Roda Husman, A.M. (2015) Role of the Environment in the Transmission of Antimicrobial Resistance to Humans: A Review. *Environ Sci Technol* 49(20), 11993-12004.
- Jansen, L.J.M., van de Schans, M.G.M., de Boer, D., Bongers, I.E.A., Schmitt, H., Hoeksma, P. and Berendsen, B.J.A. (2019) A new extraction procedure to abate the burden of non-extractable antibiotic residues in manure. *Chemosphere* 224, 544-553.

- Knudsen, B., Bergmark, L., Munk, P., Lukjancenko, O., Priemé, A., Aarestrup, F. and Pamp, S. (2016) Impact of Sample Type and DNA Isolation Procedure on Genomic Inference of Microbiome Composition. *mSystems* 1(5).
- Luby, E.M., Moorman, T.B. and Soupir, M.L. (2016) Fate and transport of tylosin-resistant bacteria and macrolide resistance genes in artificially drained agricultural fields receiving swine manure. *Sci Total Environ* 550, 1126-1133.
- Masse, D.I., Saady, N.M. and Gilbert, Y. (2014) Potential of Biological Processes to Eliminate Antibiotics in Livestock Manure: An Overview. *Animals (Basel)* 4(2), 146-163.
- McDowell, R.W., Muirhead, R.W. and Monaghan, R.M. (2006) Nutrient, Sediment, and Bacterial Losses in Overland Flow from Pasture and Cropping Soils Following Cattle Dung Deposition. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 37(1-2), 93-108.
- Mu, Q., Li, J., Sun, Y., Mao, D., Wang, Q. and Luo, Y. (2015) Occurrence of sulfonamide-, tetracycline-, plasmid-mediated quinolone- and macrolide-resistance genes in livestock feedlots in Northern China. *Environ Sci Pollut Res Int* 22(9), 6932-6940.
- Ouattara, N.K., de Brauwere, A., Billen, G. and Servais, P. (2013) Modelling faecal contamination in the Scheldt drainage network. *Journal of Marine Systems* 128, 77-88.
- Ouattara, N.K., Passerat, J. and Servais, P. (2011) Faecal contamination of water and sediment in the rivers of the Scheldt drainage network. *Environ Monit Assess* 183, 243-257.
- Schijven, J.F., Rutjes, S.A., Smeets, P. and Teunis, P.F. (2014) QMRAspot: a tool for quantitative microbial risk assessment for drinking water - Manual QMRAspot version 2.0. , RIVM, Bilthoven.
- Schijven, J.F., Teunis, P.F., Rutjes, S.A., Bouwknegt, M. and de Roda Husman, A.M. (2011) QMRAspot: a tool for Quantitative Microbial Risk Assessment from surface water to potable water. *Water Res* 45(17), 5564-5576.
- Schmitt, H., Blaak, H., Kemper, M., Van Passel, M., Hierink, F., Van Leuken, J., De Roda Husman, A.M., van der Grinten, E., Rutgers, M., Schijven, J., de Man, H., Hoeksma, P. and Zuidema, T. (2017a) Bronnen van antibioticaresistentie in het milieu en mogelijke maatregelen. RIVM rapport 2017-0058.
- Schmitt, H., ter Laak, T. and Duis, K. (2017b) Development and dissemination of antibiotic resistance in the environment under environmentally relevant concentrations of antibiotics and its risk assessment, UBA.
- Stichting Diergeneesmiddelenautoriteit (2017) Het gebruik van antibiotica bij landbouwhuisdieren in 2017, Stichting Diergeneesmiddelenautoriteit.
- Teunis, P.F., Rutjes, S.A., Westrell, T. and de Roda Husman, A.M. (2009) Characterization of drinking water treatment for virus risk assessment. *Water Res* 43(2), 395-404.
- van Leuken, J.P.G., Hoeksma, P., Nijsten, D.R.E., Schijven, J.F., Schmitt, H. and de Roda Husman, A.M. (2017) Verkenning van de microbiologische risico's van mest voor de gezondheid: Op basis van een systematisch literatuuronderzoek. RIVM (ed), RIVM, Bilthoven.
- Xie, W.Y., Shen, Q. and Zhao, F.J. (2018) Antibiotics and antibiotic resistance from animal manures to soil: a review. *European Journal of Soil Science* 69(1), 181-195.

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag