



Stichting  
Kennisontwikkeling  
Kennisoverdracht  
Bodem

# PP8348

## Antibiotica in de bodem een pilotstudie

Joost van Schijndel (Geofox-Lexmond)  
Jeroen Oosterwegel (Geofox-Lexmond)  
Robin Liefers (Geofox-Lexmond)  
Heike Schmitt (IRAS)  
Robert Schilt (DUCARES)  
Joost Lahr (Alterra wageningen UR)

December 2009

Gouda, SKB

Stichting Kennisontwikkeling en kennisoverdracht Bodem

**Auteursrechten**

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze opgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of op enige andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van SKB.

Het is toegestaan overeenkomstig artikel 15a Auteurswet 1912 gegevens uit deze uitgave te citeren in artikelen, scripties en boeken mits de bron, [SKB](#), [Gouda](#), op duidelijke wijze wordt vermeld, alsmede de aanduiding van de maker, indien deze in de bron voorkomt.”

**Aansprakelijkheid**

SKB en degenen die aan deze publicatie hebben meegewerkt, hebben een zo groot mogelijke zorgvuldigheid betracht bij het samenstellen van deze uitgave. Nochtans moet de mogelijkheid niet worden uitgesloten dat er toch fouten en onvolledigheden in deze uitgave voorkomen. Ieder gebruik van deze uitgave en gegevens daaruit is geheel voor eigen risico van de gebruiker en SKB sluit, mede ten behoeve van al degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt, iedere aansprakelijkheid uit voor schade die mocht voortvloeien uit het gebruik van deze uitgave en de daarin opgenomen gegevens, tenzij de schade mocht voortvloeien uit opzet of grove schuld zijdens SKB en/of degenen die aan deze uitgave hebben meegewerkt.

Rapportinformatieblad

**Titel rapport: Antibiotica in de bodem**

**SKB rapportnummer: PP8348**  
**Project rapportnummer: PP8348**

---

<b>Auteur(s)</b>	<b>Aantal bladzijden</b>
Joost van Schijndel (Geofox-Lexmond)	
Jeroen Oosterwegel (Geofox-Lexmond)	
Robin Liefers (Geofox-Lexmond)	
Heike Schmitt (IRAS)	
Robert Schilt (DUCARES)	
Joost Lahr (Alterra wageningen UR)	
	<b>Rapport: 24</b>
	<b>Bijlagen: A, 97</b>
	<b>B, 62</b>
	<b>C, 20</b>
	<b>D, 19</b>

---

**Uitvoerende organisaties (consortium)**

**VEWIN, Ministerie van LNV, Alterra-Wageningen UR, Ministerie van VROM (water), provincie Drenthe, IRAS, DUCARES, TNO/ Deltares, RIVM, Geofox-Lexmond**

**Klankbordleden**

**LTO-Noord, Ministerie van VROM (bodem), Fidin, KNMvD, CML, TCB**

---

**Uitgever**  
**SKB, Gouda**

---

**Trefwoorden**

Gecontroleerde trefwoorden	Vrije trefwoorden
<b>Antibiotica</b>	<b>Volksgezondheid</b>
<b>Resistentie</b>	<b>Diergezondheid</b>
<b>Dierlijke mest</b>	<b>Tetracyclinen</b>
<b>Grondwater</b>	<b>Sulfonamiden</b>
<b>Drinkwater</b>	

---

**Titel project**  
Antibiotica in de bodem

**Projectleiding**  
Geofox-Lexmond,  
Joost van Schijndel,  
Jeroen Oosterwegel

## **Voorwoord**

In het kader van een overeenkomst tussen Stichting Kennisontwikkeling Kennisoverdracht Bodem (SKB) en een breed consortium en klankbordgroep is een pilotstudie uitgevoerd naar veterinaire antibiotica in de bodem en het grondwater.

Het onderzoek is uitgevoerd op basis van interviews met diverse actoren waarvoor in een eerder stadium door het SKB aan Geofox-Lexmond een grant ter beschikking is gesteld. Naar aanleiding van deze interviews, kwam een tweetal gedeelde conclusies naar voren:

- Er is relatief weinig bekend over het gedrag van antibiotica in dierlijke mest en bodems (grond/grondwater);
- Er is in Nederland vrijwel geen chemisch analytisch veldonderzoek verricht naar aanwezigheid, gedrag en effect van antibiotica in de bodem.

Aan het consortium nemen de volgende partijen deel: Vewin, Ministerie van LNV, Alterra-Wageningen UR, Ministerie van VROM (bodem en water), provincie Drenthe, IRAS, DUCARES, Deltares, RIVM en Geofox-Lexmond. De klankbordgroep bestaat uit LTO-Noord, Fidin, KNMvD, CML en TCB.

De studie heeft bestaan uit 4 deelonderzoeken. Het onderhavige rapport bevat een integratie van de 4 deelonderzoeken en beschrijft:

- Onderwerp en onderzoeksvraag
- Aanpak en werkzaamheden
- Bevindingen deelonderzoeken
- Conclusies en aanbevelingen.

De deelonderzoeken zelf zijn als bijlagen bijgevoegd en geven in detail de verrichtte onderzoeken weer.

Penvoerder - Geofox-Lexmond - wil alle partijen van harte danken voor de positieve sfeer en constructieve opstelling gedurende het gehele onderzoeksproces, de opbouwende kritieken en de inhoudelijke bijdragen.

## **Samenvatting**

### **Aanleiding, doel en opzet onderzoek**

Studieobject is de vraag of en zo ja, in welke mate het gebruik van dierlijke mest leidt tot milieubelasting met antibiotica.

In 2007 heeft het SKB aan Geofox-Lexmond een Grant ter beschikking gesteld ten einde de veronderstelde kennislacune nader te duiden en het draagvlak bij mogelijke consortiumleden te peilen. In totaal zijn 15 interviews afgenomen waarbij de keten van antibioticatoediening in de veehouderij tot en met potentiële beïnvloeding van drinkwaterwinning is besproken. De gedeelde conclusies zijn als volgt samengevat:

- Over het gedrag van antibiotica in dierlijke mest en bodems (grond/grondwater) is relatief weinig bekend.
- In Nederland is vrijwel geen chemisch-analytisch veldonderzoek verricht naar aanwezigheid, gedrag en effect van antibiotica in de bodem.

Alle partijen onderkennen dat meer inzicht in gedrag en effecten van antibiotica in de bodem wenselijk is. Het potentiële onderzoeksveld is echter ook zeer groot. Derhalve is focus aangebracht in onderzoeksdoel, type belasting en effecten. De actoren zijn het erover eens dat onderzoek zich in eerste instantie moet richten op de volgende onderzoeksvraag:

*Vormen de met mest in de bodem gebrachte antibiotica, de daaruit voortkomende metabolieten of de door stoffen in de mest beïnvloede bacteriën, een probleem voor dier- en volksgezondheid (voedselketen, drinkwaterproductie, resistentieontwikkeling)?*

*Kort samengevat: is er een probleem?*

Onderhavige rapportage beschrijft de bevindingen van een pilotstudie. De pilotstudie is opgebouwd uit de volgende deelonderzoeken:

- A. Literatuuronderzoek
- B. Voorspellen gehalten antibiotica in grondwater (GeoPEARL)
- C. Resistentieonderzoek
- D. Mest-, grond- en grondwateronderzoek

### **Resultaten**

In de groep tetracyclinen geven oxytetracycline en doxycycline een gradiënt te zien van de hoogste gehalten in mest (tot 1973 microgram per kg -  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) naar veel lagere gehalten in de grond (tot  $0,7 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) tot niet detecteerbare gehalten in het grondwater. Tetracyclinen zijn ook uitsluitend in mest en grond in verhoogde gehalten aangetoond en niet in het grondwater hetgeen op basis van het literatuuronderzoek ook werd verwacht. De aangetoonde gehalten oxytetracycline in de grond liggen in dezelfde orde grootte als bij de realistische voorspellingsscenario's (GeoPEARL). Voor oxytetracycline werden geen aantoonbare niveau's van uitspoeling naar het grondwater (op 1 m diepte) voorspeld.

Voor de groepen sulfonamiden en quinolonen blijkt dat - uitgezonderd spoortjes van 2 quinolonen in de grond - uitsluitend gehalten zijn aangetoond in mest en grondwater. In mest is in alle monsters sulfadiazine aangetoond (maximaal  $23,2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ) en in verschillende mestmonsters zijn enkele andere sulfonamiden en quinolonen gedetecteerd. Met de realistische voorspellingsscenario's zijn voor de sulfonamiden sulfamethoxazol en sulfadiazine géén aantoonbare waarden in de grond voorspeld.

In het ondiepe grondwater (direct onder de grondwaterspiegel) zijn in de meeste monsters van zowel de bemeste akkers als naastgelegen referentielocaties sulfonamiden aangetroffen. Het hoogst gemeten gehalte (sulfamethoxazol) bedraagt 2,2 nanogram per liter ( $\text{ng}/\text{l}$ ). In het grondwater op 10 m-mv zijn in 5 van 8 peilbuizen antibiotica uit de sulfonamiden en (eenmalig) quinolonen-groep met een maximum gehalte van  $1,3 \text{ng}/\text{l}$  (sulfachloropyradizine) aangetoond. De veldmetingen worden ondersteund door de voorspelde waarden. De gehalten sulfadiazine komen namelijk redelijk overeen met die uit

het voorspelde worst-case scenario (GeoPEARL: 3,2 ng/l). Voor sulfamethoxazol werden geen aantoonbare gehalten voorspeld terwijl in slechts één grondwatermonster (bemest perceel) de stof is aangetroffen (2,2 ng/l). In het literatuuronderzoek zijn concentraties in het grondwater naar voren gekomen die een factor 1000 hoger liggen (bijvoorbeeld 7,6 ug/l voor sulfamethiazine) dan in onderhavige studie zijn aangetoond.

Het analytisch onderzoek heeft aangetoond dat analyse van mestmonsters goed is verlopen (bruikbare LOQ's). Grondmonsters hebben lage recoveries laten zien, vermoedelijk veroorzaakt door te sterke hechting van stoffen aan het monstermateriaal.

De gen-analyses lieten duidelijke verschillen tussen de veldlocaties en de referentielocaties zien. De voor de totale DNA hoeveelheid in de DNA extracten gecorrigeerde resistentieniveaus van het sul2 gen (één van de drie bekende sulfonamide-resistentie genen) lagen voor de bemesting in de veldlocaties licht, maar significant hoger dan in de referentielocaties. De referentielocaties toonden verder een constant niveau van sul2 resistentie, dat vaak rond of beneden het detectielimiet lag. TetM was in de referentielocaties niet aan te tonen. In de veldlocaties steeg de hoeveelheid aan sul2 met de bemesting in alle drie locaties significant, met  $\pm$  factor 10. De niveaus daalden vervolgens bij de latere bemestingen. Voor tetM konden alleen na bemesting meetbare hoeveelheden worden gevonden. De tetM gehalten in de veldmonsters volgden hetzelfde patroon als sul2. Deze waarden bevestigen dus de instroom van resistentie genen met de intestinale flora. De hier gevonden proportie van sul2 resistentie ligt in dezelfde orde van grootte als in een laboratoriumstudie, waarbij mest van een met sulfadiazine behandeld varken op grond uitgebracht werd. Onze veldwaarnemingen bevestigen dus waarnemingen uit laboratoriumstudies. De analyses van het sulfonamide en tetraculine resistentie gen laten zien dat mest daadwerkelijk op veldniveau tot een stijging van het resistentieniveau kan leiden.

### **Conclusies en aanbevelingen**

Geconcludeerd wordt het volgende:

- op de onderzochte akkers komen hogere hoeveelheden van het resistentiegen voor sulfonamiden (sul2) voor dan op naastgelegen referentielocaties. Tevens is na bemesting sprake van een verdere toename van de hoeveelheid resistentiegen; 4 weken na bemesting is de hoeveelheid resistentiegen nog steeds hoger dan vóór bemesting. Het gen tetM laat hetzelfde patroon zien. TetM is niet aangetoond op de referentielocaties en slechts in één van de drie bemeste akkers voorafgaande aan de mestgift.
- er zijn geen aanwijzingen gevonden voor verhoogde resistentie in E. coli en oligotrofe en copiotrofe bodembacteriën;
- in mest en grond van bemeste akkers zijn antibiotica uit de groepen tetracyclinen, sulfonamiden en quinolonen aangetoond;
- de gemeten gehalten in mest liggen ver boven LOQ\*, de gemeten gehalten in grond allen beneden LOQ.
- in het grondwater direct onder de grondwaterspiegel onder bemeste akkers zijn concentraties en sporen antibiotica en metabolieten aangetoond op het ng/l niveau (rond en beneden LOQ);
- in het provinciaal meetnet zijn in 4 peilbuizen nabij maïspcelen op 10 meter beneden maaiveld (m-mv) in al de vier watermonsters gehalten antibiotica aangetoond op niveau van minder dan 1 ng/l (beneden LOQ);
- in 4 bemonsterde peilbuizen in natuurgebieden zijn in drie monsters geen gehalten antibiotica aangetoond en is in één peilbuis een gehalte antibioticum aangetroffen van 1,3 ng/l (rond LOQ).

\* LOQ: grens waarvan af het gehalte met een acceptabele betrouwbaarheid kan worden bepaald

De gemeten concentraties in bodem en grondwater komen in orde van grootte overeen met de voorspelde waarden (Geoparl).

Aangezien vrijwel geen referenties beschikbaar zijn en in Nederland vrijwel geen ander veldonderzoek is verricht, is het niet zinvol om een waardeoordeel te geven aan de aangetroffen meetwaarden. Gezien het indicatieve karakter van de studie is het niet mogelijk om aan te geven in hoeverre sprake is van een mogelijk probleem voor dier- en volksgezondheid.

Op basis van de conclusies van onderhavige pilotstudie wordt aanbevolen om het consortium en SKB een vervolgstudie te laten uitvoeren, gericht op het verzamelen van data en het uitvoeren van onderzoek naar het gedrag van dierlijke antibiotica in het milieu (transport, sorptie, biologische afbraak), de mogelijke overdracht van resistentiegenen van bacteriën in de bodem op mens en dier en de mogelijke verstoring van ecosystemendiensten van bodem en grondwatersystemen.

## Inhoudsopgave

# PP8348..... I

1.	Inleiding .....	1
1.1	Onderwerp en onderzoeksvraag .....	1
1.2	Samenstelling consortium en klankbord .....	2
2.	Aanpak en werkzaamheden .....	6
3.	Bevindingen deelonderzoeken. ....	9
3.1	Literatuuronderzoek .....	9
3.2	Modelleren lotgevallen antibiotica in bodem en grondwater (GeoPEARL) .....	11
3.3	Resistentieonderzoek .....	12
3.4	Onderzoek van grondwater, bodem en mest .....	13
4.	Conclusies en aanbevelingen .....	14
	Bijlagen.....	16

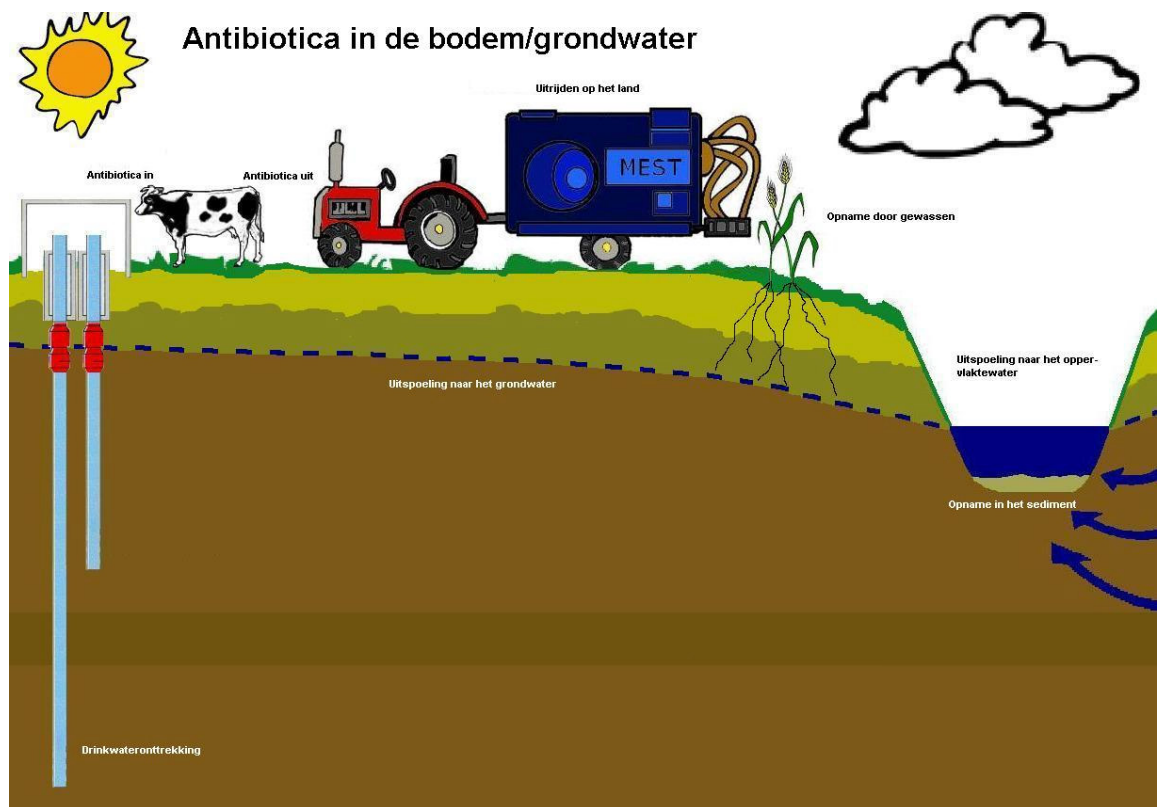


# 1. Inleiding

## 1.1 Onderwerp en onderzoeksvraag

Studieobject is de vraag of en zo ja, in welke mate het gebruik van dierlijke mest leidt tot milieubelasting met antibiotica. Hierbij is focus aangebracht door met name te kijken naar de intensieve veehouderij en de mestverspreiding in waterwingebieden (zie verder).

In figuur 1 is een overzicht gegeven van de milieucompartimenten waarin antibiotica mogelijk terecht komen vanaf toediening aan het dier tot grondwateronttrekking ten behoeve van de drinkwaterwinning.



figuur 1: Antibiotica in de bodem/grondwater

In 2007 heeft het SKB aan Geofox-Lexmond een Grant ter beschikking gesteld ten einde de veronderstelde kennislacune nader te duiden en het draagvlak bij mogelijke consortiumleden te peilen. In totaal zijn 15 interviews afgenomen waarbij de keten van antibiotica van toediening in de veehouderij tot potentiële beïnvloeding van drinkwaterwinning is besproken. De gedeelde conclusies zijn als volgt samengevat:

- Over het gedrag van antibiotica in dierlijke mest en bodems (grond/grondwater) is relatief weinig bekend.
- In Nederland is vrijwel geen chemisch-analytisch veldonderzoek verricht naar aanwezigheid, gedrag en effect van antibiotica in de bodem.

Alle partijen onderkennen dat meer inzicht in gedrag en effecten van antibiotica in de bodem wenselijk is. Het potentiële onderzoeksveld is echter ook zeer groot. Derhalve is focus aangebracht in onderzoeksdoel, type belasting en effecten. De actoren zijn het erover eens dat onderzoek zich in eerste instantie moet richten op de volgende onderzoeksvraag:

*Vormen de met mest in de bodem gebrachte antibiotica, de daaruit voortkomende metabolieten of de door stoffen in de mest beïnvloede bacteriën een probleem voor dier- en volksgezondheid (voedselketen, drinkwaterproductie, resistentieontwikkeling)? Kort samengevat: is er een probleem?*

De onderzoeksaanpak is met geïnterviewden besproken en verder vorm gegeven in een workshop gehouden op 24 april 2008 bij de SKB te Gouda. De SKB heeft ernaar gestreefd om met deze wijze tot een door diverse eindgebruikers, onderzoekers en klankbordleden (zie volgende paragraaf) gedragen onderzoek te komen.

## **1.2 Samenstelling consortium en klankbord**

Er is een breed consortium en klankbord samengesteld van in totaal 16 partijen. Per consortium- en klankbordlid wordt aangegeven wie de contactpersoon is, de rol van het lid in relatie tot de onderzoeksvraag en het belang van deelname aan het consortium of klankbord.

### **Consortium deelnemer: VEWIN**

contactpersoon: mw. Nicole Zantkuijl

#### *Rol in relatie tot de opgave:*

VEWIN is de branche vereniging van waterwinbedrijven in Nederland. Haar rol in dit consortium is die van eindgebruiker.

#### *Belang van deelname:*

Aandachtspunten voor de VEWIN vormen bacteriologische resistentie, het proces van eventuele accumulatie van antibiotica in bodem en grondwater, het proces van uitspoeling naar het diepere grondwater en naar het oppervlakte water en de eventuele effecten daarvan. Daarnaast is VEWIN geïnteresseerd in het effect van huidige waterzuiveringssystemen op verontreinigingen door (dier) geneesmiddelen (dan wel de ontwikkelingen daarin).

Ook wordt de vraag neergelegd of de mest te zuiveren is van diergeneesmiddelen.

### **Consortium deelnemer: Ministerie LNV**

Contactpersoon: mw. Marjan Hopman

#### *Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van LNV in dit consortium is die van eindgebruiker. Met name uit hoofde van de verantwoordelijkheid van het ministerie inzake de voedselveiligheid, diergezondheid en – samen met VROM - bodemkwaliteit.

#### *Belang van deelname:*

Wat voor LNV vooral interessant is, zijn de risico's in de keten, het ecosysteem: voor dieren, planten en voedsel. Met name ook de eventueel optredende resistentie en de effecten daarvan.

### **Consortium deelnemer: Alterra-Wageningen UR**

Contactpersoon: dhr. Joost Lahr

#### *Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van Alterra-Wageningen UR in dit consortium is die van onderzoeker.

#### *Belang van deelname:*

Alterra-Wageningen UR heeft kennis en ervaring aangaande onderzoek naar het gedrag van stoffen in de bodem en het effect van diergeneesmiddelen op het bodemecosysteem.

**Consortium deelnemer: Ministerie VROM (water)**

Contactpersoon: de heer Sybrand Landman (kwaliteit en ketens).

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van VROM(water) is die van eindgebruiker. Met name uit hoofde van haar regierol in de werkgroep '(dier)geneesmiddelen en watermilieu'.

*Belang van deelname:*

De rol van de bodem is relatief nieuw voor de werkgroep. De invloed vanuit bodem op het watersysteem kent nog veel kennislacunes. Interesse is aanwezig, tevens wordt aangegeven contact te zoeken met vertegenwoordigers van VROM-bodem.

**Consortium deelnemer: Provincie Drenthe**

Contactpersoon: dhr. Alex Scheper

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van de provincie Drenthe in dit consortium is die van eindgebruiker.

*Belang van deelname:*

Drenthe is bevoegd gezag Wet bodembescherming, stelt grondwaterbeschermingsgebieden vast en is vergunningverlener voor drinkwaterwinningen.

**Consortium deelnemer: IRAS**

Contactpersoon: mw. Heike Schmitt

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van IRAS in dit consortium is die van onderzoeker/klankbord.

*Belang van deelname:*

IRAS heeft een brede kennis en expertise aangaande het gedrag van medicijnen in het milieu.

**Consortium deelnemer: RIVM**

Contactpersoon: dhr. Ton van der Linden en dhr. Peter van Vlaardingen

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van RIVM in dit consortium is die van onderzoeker/klankbord.

*Belang van deelname:*

RIVM heeft een brede kennis en expertise aangaande het gedrag van medicijnen in het milieu.

**Consortium deelnemer: DUCARES B.V.**

Contactpersoon: dhr. Robert Schilt

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van DUCARES in dit consortium is die van onderzoeker/klankbord.

*Belang van deelname:*

DUCARES B.V. heeft jarenlange ervaring op het gebied van kwalitatieve en kwantitatieve residuanalyse van hormonen, overige verboden stoffen en diergeneesmiddelen (antibiotica) voor o.m. diverse primaire veeteeltsectoren.

**Consortium deelnemer: Deltares**

Contactpersoon: dhr. Jan Gerritse

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van Deltares in dit consortium is die van onderzoeker/klankbord.

*Belang van deelname:*

Deltaris heeft brede kennis en expertise aangaande gedrag van verontreinigende stoffen in het milieu.

**Consortium deelnemer: Geofox-Lexmond**

Contactpersoon: dhr. Jeroen Oosterwegel en dhr. Joost van Schijndel

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van Geofox-Lexmond in dit consortium is die van onderzoeker en penvoerder.

*Belang van deelname:*

Geofox-Lexmond heeft een brede kennis en expertise aangaande bodem en grondwaterverontreinigingen en is initiatiefnemer van het SKB voorstel Antibiotica in de bodem.

**Klankbord deelnemer: LTO Nederland**

Contactpersoon: mw. Janet Bakker

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van LTO Nederland in dit consortium is die van klankbord.

*Belang van deelname:*

De sector is geïnteresseerd in evt. milieu-effecten van antibioticagebruik.

**Klankbord deelnemer: Ministerie VROM (bodem)**

Contactpersoon: mw. Maartje Nelemans, VROM (duurzaam bodembeheer)

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van VROM(bodem) is die van eindgebruiker.

Voor de beleidshoek is vooral het voorkómen van het afwentelen van economisch handelen op volksgezondheid of ecologie interessant:

- 1 Reduceren humane risico's, bevorderen volksgezondheid;
- 2 Behoud van de vruchtbaarheid van de bodem;
- 3 Ecologische kwaliteit oppervlaktewater;
- 4 Ecologische kwaliteit gewassen;
- 5 (Borgen economisch belang veehouderijen).

*Belang van deelname:*

Resistentie is een aandachtspunt. Er is weinig bekend en allereerst zal inzicht moeten worden verschaft in de "sence of urgency" ofwel is er een probleem?

**Klankbord deelnemer: FIDIN**

Contactpersoon: dhr. Björn Eusser

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van FIDIN (vereniging van Fabrikanten en Importeurs van Diergeneesmiddelen In Nederland) is die van eindgebruiker.

*Belang van deelname:*

De branche wil graag op de hoogte zijn van effecten van hun producten in het milieu, juist ook als die effecten negatief zijn. De FIDIN kan er echter ook belang bij hebben als de resultaten van het onderzoek maken dat individuele milieustudies voor diergeneesmiddelen minder nodig zijn.

**Consortium deelnemer: KNMvD**

Contactpersoon: dhr. Hugo de Groot

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van de KNMvD in dit consortium is die van klankbord.

*Belang van deelname:*

Dierenartsen worden geacht de rol van poortwachter te vervullen ten aanzien van het antibiotica gebruik in de intensieve veehouderij.

**Klankbord deelnemer: CML**

Contactpersoon: dhr. Wil Tamis

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van CML in dit consortium is die van klankbord.

*Belang van deelname:*

CML heeft kennis en ervaring aangaande onderzoek naar het effect van diergeneesmiddelen op het bodemecosysteem

**Klankbord deelnemer: TCB**

Contactpersoon: Marlies ten Hove

*Rol in relatie tot de opgave:*

De rol van CML in dit consortium is die van klankbord.

*Belang van deelname:*

De Technische Commissie Bodembescherming (TCB) adviseert de ministers van VROM en LNV over de technische en wetenschappelijke aspecten van bodembescherming.

Onderhavig project is specifiek van belang voor het door de TCB uit te brengen advies "Nieuwe verontreinigingen van bodem in landelijk gebied".

## 2. Aanpak en werkzaamheden

Zoals aangegeven in hoofdstuk 1 wordt in grote lijnen de mening van de geïnterviewde partijen en deelnemers aan het consortium en klankbord gedeeld dat er relatief weinig bekend is over het gedrag van, door dierlijke mest, in het milieu gebrachte antibiotica.

Vervolgens is de primaire vraag: Is er een probleem? Over het verwachte antwoord op deze vraag lopen de meningen uiteen. Er is wel een grote mate van consensus dat het wenselijk is deze vraag primair te beantwoorden.

Door velen is aangegeven dat een eerste fase onderzoek zich zou moeten richten op de volgende vragen:

- Maak door literatuuronderzoek het proces en bijbehorende deelprocessen, van toediening van antibiotica tot en met de kwaliteit van onttrokken grondwater tbv drinkwaterwinning, inzichtelijk.  
Specifiek onderdeel van deze vraag is of het mogelijk is onderscheid te maken tussen diverse bronnen (zoals intensieve landbouw, viskwekerijen, humaan gebruik);
- Wat zijn de effecten (Is er een probleem?) door feitelijk de bodem als black box te beschouwen en de volgende effecten te onderzoeken:
  - o Is er een verschil in bacteriologische resistentie t.a.v. in de veehouderij toegepaste antibiotica tussen intensief bemeste grond en niet met dierlijke mest belaste grond?
  - o Is het ondiepe grondwater belast met antibiotica, zowel analytische bepalingen als d.m.v. resistentie bepalingen (met in onderhavig project focus op enkele meest gebruikte stoffen).

Indien resultaten daartoe aanleiding geven zou in een tweede fase onderzoek moeten worden verricht naar:

- Opname van antibiotica dan wel resistentie in de voedselketen.
- Controle van de actuele waterkwaliteit in drinkwaterputten waarvan op grond van macroparameters (NO<sub>3</sub>-)verwacht mag worden dat kwaliteit door bemesting is beïnvloed. Hierbij zal tevens moeten worden aangegeven of het mogelijk is onderscheid te maken tussen diverse mogelijke bronnen.

Onderhavige rapportage beschrijft de bevindingen van de pilotstudie die in het kader van de eerste fase is uitgevoerd. De pilotstudie is opgebouwd uit de volgende deelonderzoeken:

- E. Literatuuronderzoek
- F. Voorspellen gehalten antibiotica in grondwater (GeoPEARL)
- G. Resistentieonderzoek
- H. Grondwater-, bodem- en mestonderzoek

### *Ad A. Literatuuronderzoek*

De literatuurstudie is uitgevoerd om inzicht te verkrijgen in voorkomen, emissie, transport, gedrag, aanwezigheid en consequenties van dierlijke antibiotica in grond en grondwater. Hiertoe is een procesanalyse uitgevoerd en een inventarisatie van vigerende wet- en regelgeving waarbij de focus is gelegd op de intensieve veehouderij in waterwingebieden met de grootste hoeveelheid verspreide mest en een voor uitspoeling gevoeligste bodemtype. Het literatuuronderzoek is verder afgebakend door voornamelijk de Nederlandse situatie te beschrijven en de meest gebruikte antibiotica te onderzoeken.

#### *Ad B Modelleren van het gedrag van antibiotica in bodem en grondwater (GeoPEARL)*

Er wordt sinds jaren gewerkt aan rekenmodellen voor de lotgevallen van bestrijdingsmiddelen in het milieu. Een van deze modellen, GeoPEARL, berekent de uitspoelconcentraties van middelen en de persistentie in het grondwater en in de toplaag van de bodem na toediening op het land. GeoPEARL 3.3.3 is in principe ook te gebruiken voor andere stoffen die op het land terecht komen zoals antibiotica.

De basisgedachte is dat indien het GeoPEARL model voor antibiotica geschikt blijkt te zijn, het model in de toekomst kan worden gebruikt om de uitspoelconcentraties en de persistentie concentraties in het grondwater en de bodem landelijk voor diverse middelen te modelleren. Dit is nuttig voor het bepalen van gebieden en/of soorten teelten met de hoogste risico's (hot spots) b.v. in het kader van monitoring en bij de beoordeling van risico's in het kader van de toelating van bepaalde middelen.

Daarom is nagegaan in hoeverre GeoPEARL 3.3.3 kan worden gebruikt voor de modellering van het gedrag van antibiotica in bodem en grondwater. Hiervoor zijn voor een beperkt aantal antibiotica fysisch-chemische gegevens verzameld en aan een viertal toepassingsscenario's onderworpen. Voor de scenario's (vrachten naar de bodem) is gebruik gemaakt van de uitkomsten van de recente studie naar de risico's van diergeneesmiddelen in het terrestrische milieu door het CML (Tamis et al., 2008, CML-rapport 178).

#### *Ad C Resistentieonderzoek*

Tijdens de workshop van 24 april 2008 (zie paragraaf 1.1) is de onderzoeksvraag voor dit deelonderzoek als volgt geformuleerd:

*Wordt natuurlijke resistentie in de bodem verhoogd door mesttoediening?*

De basisgedachte hierbij is om op twee groepen meetplots genonderzoek op microbiële antibiotica resistentie uit te voeren. Eén groep plots die langdurig met dierlijke mest, afkomstig uit intensieve veehouderij, is behandeld. En één groep plots als referentie van niet door dierlijke mest belaste percelen. Gezien jaarlijkse vracht en stofkenmerken is in eerste instantie het onderzoek gericht op tetracyclines (specifiek oxytetracycline).

Doel is om middels een quickscan een indicatie te verkrijgen van een mogelijke verhoging van de natuurlijke resistentie voor antibiotica door mesttoediening.

Ten eerste wordt moleculaire resistentie in de hele microbiële gemeenschap onderzocht. Omdat bodembacteriën voor een groot deel niet te kweken zijn, kan met DNA-gebaseerde methoden een completer beeld van de hele gemeenschap verkregen worden. Dit wordt gedaan door middel van een extractie van bacteriële DNA uit de bodem, en kwantitatieve bepalingen van het voorkomen van resistentiegenen in dit DNA.

Ten tweede is de resistentie in kweekbare bacteriën onderzocht. Daarvoor is in eerste instantie gekozen voor *E. coli*, omdat deze kiem een indicatorkiem voor fecale belasting is, en omdat het resistentiepatroon van *E. coli* goed is onderzocht. Tijdens de laboratoriumwerkzaamheden bleek dat op de referentielocaties te weinig *E. coli* aantoonbaar zijn en daardoor geen uitspraak was te doen over het al dan niet sprake zijn verhoogde resistentie ten opzichte van nature optredende resistentie. Daarom zijn aanvullend oligotrofe en copiotrofe bodembacteriën op kweek gezet en is daarvan de resistentie bepaald.

#### *Ad D Onderzoek grondwater, bodem en mest*

De onderzoeksvraag van dit deelonderzoek luidt: Leidt bodembemesting met dierlijke mest tot aantoonbare belasting van het grondwater?

Basisgedachte bij dit deelonderzoek is om onderzoek te verrichten naar kwaliteit van grondwater onder een langdurig bemest perceel met dierlijke mest afkomstig uit de intensieve veehouderij en bij voorkeur in een grondwaterwingebied. Voor de referentielocaties is een methodologie uitgewerkt op basis waarvan de locaties zijn geselecteerd.

Analyse heeft in eerste instantie plaatsgevonden op sulfamethoxazol, het in Nederland meest gebruikte antibioticum uit de groep sulfonamiden. Voor de kwantitatieve analyse is UPLC-tandem massaspectrometrie gebruikt. Deze methodiek heeft de noodzakelijke selectiviteit en gevoeligheid om met een grote betrouwbaarheid lage gehalten sulfamethoxazol (sub-ppb niveau) in grondwater te kunnen meten.

Tijdens de laboratoriumwerkzaamheden werd duidelijk dat de gehalten in grondwater zich op het niveau van nanogram per liter bevonden. Door de analyse tot één stof te beperken zouden de resultaten van het onderzoek zeer summier worden en onvoldoende indicatie opleveren van het vóórkomen van antibiotica in het grondwater. Om die reden is het onderzoek uitgebreid met de analyse van veelgebruikte antibiotica in de groepen tetracyclinen, sulfonamiden en quinolonen en de analyse van grond- en mestmonsters.

De veld- en laboratoriumstudie van resistentie- en grondwateronderzoek heeft samengevat bestaan uit:

- het nemen van mest-, grond- en grondwatermonsters op maïsakkers van in totaal 3 varkenshouderijbedrijven (2 bedrijven uit Noord-Brabant en 1 bedrijf uit Overijssel). Monsters zijn genomen van april tot begin juni 2009 direct vóór en direct ná bemesting en vervolgens 1 week en 4 weken later;
- het in dezelfde periode nemen van grond- en grondwatermonsters op 3 referentielocaties (direct naast de bedrijven gelegen locaties met onder meer vergelijkbare bodemopbouw);
- het nemen van grondwatermonsters in juli 2009 uit 8 peilbuizen van het provinciaal meetnet van de provincie Drenthe op een diepte van 10 meter beneden maaiveld (4 peilbuizen dicht bij maïsakkers en 4 peilbuizen in natuurgebieden);
- het bepalen van resistentiegenen en van de genomen grondmonsters;

het analyseren van mest-, grond en grondwatermonsters op veelgebruikte antibiotica in de groepen tetracyclinen, sulfonamiden en quinolonen .

In tabel 2.1 is het uitgevoerde bemonsteringsprogramma voor het resistentie- en grondwateronderzoek samengevat.

**Tabel 2.1 Uitgevoerde bemonsteringsprogramma pilotstudie**

Locatie	Grond (resistentie)				Grondwater ondiep (open boorgat)				Grondwater peilbuizen	
	voor bemesten	direct na bemesten	1 week na bemesten	4 weken na bemesten	voor bemesten	direct na bemesten	1 week na bemesten	4 weken na bemesten		
bedrijf OB 1	1	1	1	1	1	1	1	1	Ondiep prov meetnet	
referentie OB 1	1	1	1	1	1					
bedrijf OB 2	1	1	1	1	1	1	1	1		
referentie OB 2	1	1	1	1	1					
bedrijf OIJ 1	1	1	1	1	1	1	1	1		
referentie OIJ 1 nabij maïsakkers	1	1	1	1	1					
Drenthe natuurgebied										4
Drenthe										4
subtotaal aantal monsters	6	6	6	6	6	3	3	3	8	



### **3. Bevindingen deelonderzoeken.**

#### **3.1 Literatuuronderzoek**

Het literatuuronderzoek is ingegaan op de wetgeving, het stofgedrag, de mogelijke effecten en risico's van veterinaire antibiotica in de bodem en het oppervlaktewater. Navolgend worden per item de conclusies beschreven. Afsluitend worden de kennislacunes benoemd.

Het wettelijk kader is onder te verdelen in product- en kwaliteitsregelgeving. In de productregelgeving wordt gereguleerd waar antibiotica aan moeten voldoen. Zo moet er bijvoorbeeld een milieubeoordeling plaatsvinden waarin onderzocht wordt of een antibioticum geen negatieve effecten heeft op of in het milieu. Wanneer een antibioticum negatieve effecten heeft wordt geen vergunning afgegeven. Onduidelijk is of onderzoek naar resistentie onderdeel uitmaakt van de milieubeoordeling. Naast de productregelgeving is er de kwaliteitsregelgeving. In de kwaliteitswetgeving worden antibiotica niet direct gereguleerd. Er zijn bijvoorbeeld geen normen opgesteld voor antibiotica in de bodem en het grondwater. Wel geldt er een zorgplichtbepaling die aangeeft dat verontreinigingen in de bodem waar de mens en het milieu schade van ondervinden, tegen moet worden gegaan. Op basis van een uitspraak van het Europese Hof van Justitie kan worden opgemaakt dat de Nitraatrichtlijn het exclusieve kader vormt voor het beoordelen van waterverontreiniging die door meststoffen kan zijn ontstaan. Het opmerkelijke hieraan is dat de Nitraatrichtlijn op stofniveau alleen gericht is op nitraat en niet op andere stoffen.

Naast de indirecte invloed van het wettelijk kader zijn er veel overige (biotische en abiotische) factoren die een invloed uitoefenen op het voorkomen van antibiotica in de grond en het grondwater. Hierdoor is het lastig om de mogelijke invloed van één specifieke factor te onderscheiden en te bepalen. In de intensieve veehouderij worden diverse groepen antibiotica gebruikt. Op basis van het jaarlijkse gebruik, de toepassing en de globale eigenschappen zijn de sulfonamiden (sulfamethoxazol) en de tetracyclinen (oxytetracycline) in deze literatuurstudie geselecteerd en verder behandeld (gedrag, effecten, verspreiding in het milieu en risico's). Antibiotica dienen na opname in het organisme snel te worden afgebroken of via mest en urine – al dan niet gemetaboliseerd – te worden uitgescheiden om de aanwezigheid in levensmiddelen tegen te gaan. Door uitscheiding via mest en urine kunnen antibiotica verspreiden naar bodem en/of oppervlaktewater. Hier kunnen antibiotica zich ophopen, verspreiden, afbreken en/of metaboliseren. Bij het gedrag in het milieu spelen veel factoren een rol. In dit onderzoek is naar voren gekomen dat de hoeveelheid mest (en daarmee antibiotica), de pH, de temperatuur, de hoeveelheid water (hydrolyse), de hoeveelheid bacteriën, fractie organische koolstof, fractie zand, fractie klei, fractie silt en de hoeveelheid mineralen invloed hebben op het milieugedrag. Daarnaast spelen fotolyse en de zuurstofhoeveelheid mogelijk een rol. Over het algemeen kan geconcludeerd worden dat oxytetracycline sterk adsorbeert aan bodemdeeltjes en dat sulfamethoxazol mobiel is. De afbraak van sulfamethoxazol en oxytetracycline kan, afhankelijk van de diverse factoren, variëren van enkele dagen tot jaren. Over het metaboliseren van deze stoffen zijn weinig gegevens gevonden.

Voor de verspreidingsroute van antibiotica via mest, is naast het gehalte antibiotica in mest ook de bemestinggraad een belangrijke factor in het bepalen van de milieubelasting met antibiotica. Voor de bemestinggraad zijn de mestgegevens (stikstofbelasting) van het CBS voor de drie belangrijkste producenten van mest bestudeerd: runderen, varkens en pluimvee (kippen). Daarbij is onderscheid gemaakt in graslanden en akkers. Uit de gegevens van het CBS wordt duidelijk dat de meeste mest op akkers wordt toegepast in een aantal akkerbouwregio's in het (noord) oosten, zuiden en midden van het land. Het betreft hierbij varkensdrijfmest. Op grasland zijn dit graslandregio's in het westen van Friesland en het oosten van Zuid-Holland. Hier wordt vooral mest van melkkoeien toegepast. Het gehalte in mest is niet te meten (er zijn geen geschikte analysemethoden beschikbaar) maar op basis van antibioticagebruik en aannames wordt de zogenaamde PEC (predicted environmental concentration) berekend.

Antibiotica in bodem (grond en grondwater) of oppervlaktewater kunnen een direct of indirect effect uitoefenen op aanwezige organismen. De beperkt beschikbare veldgegevens wijzen op het volgende beeld. De kans dat antibiotica een direct effect hebben op bodemorganismen is vrijwel nihil omdat daarvoor de concentraties in het algemeen te laag zullen zijn. Antibiotica zullen gezien hun aard waarschijnlijk wel invloed hebben op bodembacteriën en microbiële processen.

Directe effecten voor de volksgezondheid zijn niet waarschijnlijk. Antibiotica zijn weliswaar aangetoond in consumptiegewassen en drinkwater(-bronnen) maar de concentraties zijn dusdanig laag dat geen effecten zijn te verwachten. Indirecte effecten kunnen in potentie ontstaan indien resistentievorming optreedt. Resistente bacteriën worden via de mest verspreid naar de bodem. Ook in grondwater en drinkwaterbronnen zijn resistentiegenen aangetoond. Het is niet duidelijk of deze aan veterinair en/of humaan gebruikte antibiotica zijn te relateren.

#### Kennislacunes:

Op basis van de literatuurstudie die is uitgevoerd kan een aantal belangrijke kennislacunes worden afgeleid. Hierbij gaat het om lacunes in de kennis voor wat betreft de Nederlandse situatie en een aantal algemene wetenschappelijke lacunes. Deze "kennislacunes" worden hieronder weergegeven:

- In Nederland zijn (vrijwel) geen veldstudies bekend waarin het vóórkomen van antibioticaresiduen, afkomstig uit de veehouderij, in de grond en het grondwater is onderzocht;
- Er is weinig openbare en direct beschikbare informatie voor handen over de verkoop en het gebruik van de actieve bestanddelen;
- In studies worden verschillende stoffen onderzocht. Er zijn geen onderzoeken bekend waarin één actieve stof gevolgd wordt, vanaf de inname tot en met de uitstoot in het milieu;
- Het is onbekend hoeveel en welke metabolieten er precies gevormd worden in de landbouwhuisdieren, de mest en in de bodem;
- Het is onbekend hoeveel oxytetracycline, sulfamethoxazol en resistentiegenen er precies afgebroken wordt in de landbouwhuisdieren, de mest, de bodem en het grondwater;
- Over antibiotica in mest en de negatieve effecten hiervan op de macrofauna in de mest (vliegen, kevers, enz.) zijn voor zover geen studies bekend;
- Het is moeilijk vast te stellen hoe de antibiotica precies zullen uitwerken op de bacteriegemeenschappen in de mest en de bodem. Ook de invloed op de bodemprocessen is te weinig onderzocht;
- Er zijn vooral Deense, Duitse, Engelse en Amerikaanse onderzoeken gedaan naar het gedrag van oxytetracycline, sulfamethoxazol en resistentiegenen in de bodem en het grondwater. Wanneer de relevante onderzoeken naast elkaar worden gelegd, is te zien dat vaak punten missen of te weinig onderzoek is gedaan (bijvoorbeeld hydrolyse en fotolyse). Ook zijn er weinig/geen toxiciteitsgegevens bekend. Wanneer het gedrag onbekend is, zijn de effecten en de risico's ook moeilijk te bepalen. Resistentie treedt waarschijnlijk wel op. Hierbij zijn echter de drempelconcentraties onduidelijk;
- Over accumulatie van oxytetracycline, sulfamethoxazol en resistentiegenen in de bodem en gewassen is weinig bekend. Hierdoor is er onder andere weinig inzicht in de rol van de bodem als mogelijk reservoir;

Over bio-accumulatie en doorvergiftiging in hogere organismen is niets bekend, maar de kans hierop is voor de meeste antibiotica waarschijnlijk klein.

### 3.2 Modelleren lotgevallen antibiotica in bodem en grondwater (GeoPEARL)

Bij de milieubeoordeling van diergeneesmiddelen worden door de voor de registratie verantwoordelijke instanties voor het afleiden van de lotgevallen (gedrag en persistentie) in bodem en grondwater modelstudies voorgesteld. In Nederland zijn de afgelopen jaren modellen ontwikkeld waarmee men de uitspoeling van gewasbeschermingsmiddelen naar het grondwater kan beoordelen. Recent is voor dit doel een nieuwe versie van het model GeoPEARL 3.3.3 uitgebracht. Hiermee kan men ook de persistentie in de toplaag van de bodem beoordelen. Door Alterra is een korte oriënterende studie uitgevoerd om na te gaan in hoeverre dit model ook kan worden gebruikt voor het modelleren van de lotgevallen van antibiotica. De studie betrof het opzoeken en invoeren van gegevens en het doorrekenen van enkele scenario's, maar nog geen validatie van de resultaten van de modelvoorspellingen door toetsing aan meetgegevens.

Er werden op basis van hun gebruik in Nederland vier antibiotica geselecteerd: oxytetracycline, sulfamethoxazol, sulfadiazine en trimethoprim. Voor deze stoffen werden de fysische en chemische eigenschappen uit de literatuur verzameld voor invoer in het model. Het bleek voor deze stoffen en ook voor enkele andere diergeneesmiddelen lastig om goede gegevens te vinden in de openbare literatuur. Voor de modellering werd een aantal scenario's opgesteld voor een voorjaarstoediening via mest aan maïsakkers. De scenario's verschilden in realisme (realistisch versus een 'worst case') en in toedieningswijze (diepte van de toediening, inwerken versus injecteren).

De berekende uitspoelconcentraties waren allen laag voor de realistische scenario's. Oxytetracycline, sulfamethoxazol en sulfadiazine spoelen volgens de berekeningen niet uit, trimethoprim in een lage concentratie. Trimethoprim spoelt aanzienlijk meer uit onder extreme 'worst case' omstandigheden (langere halfwaardetijd, hoge vracht). De uitspoelconcentraties lagen bij het realistische scenario echter onder de Europese drempelconcentratie van 0.1 µg/L voor grondwater.

Qua persistentie zijn met GeoPEARL de bodem- en poriewater concentraties 2 jaar en 7 jaar na stoppen van een jaarlijkse toediening gedurende 20 jaar bepaald. Sulfamethoxazol en sulfadiazine komen na 2 jaar niet meer voor in de bodem en het poriewater. Oxytetracycline is persistenter en zou volgens de modelberekeningen na 2 jaar nog in de bodem aanwezig zijn maar niet in het poriewater. Trimethoprim, ten slotte, is van de stoffen het meest persistent. In de realistische scenario's is deze stof 7 jaar na stoppen van de jaarlijkse toedieningen echter ook verdwenen uit de toplaag.

Trimethoprim behoeft meer aandacht in risicoanalyses en bij monitoring. Het spoelt van de vier middelen het meeste uit en is persistent. Ook wordt het middel in combinatie met verschillende andere antibiotica gebruikt waardoor de totale vracht naar het milieu groter zal zijn dan op basis van het gebruik van één soort medicijn.

Voor alle berekende parameters geldt dat er geen grote verschillen waren tussen de drie doorgerekende realistische toedieningsscenario's: inwerken over 5 cm, inwerken over 15 cm en injecteren op 15 cm.

De uitkomst van de GeoPEARL berekeningen staat of valt met de beschikbaarheid van betrouwbare gegevens om in het model in te voeren. Op basis van deze studie mag echter geconcludeerd worden dat, indien er goede invoergegevens beschikbaar zijn, GeoPEARL in principe gebruikt kan worden voor het modelleren van de lotgevallen van diergeneesmiddelen ten behoeve van de risicobeoordeling voor registratiedoeleinden. Er kunnen verschillende relevante scenario's voor diergeneesmiddelen worden doorgerekend. Het model zou in de toekomst kunnen worden ingezet bij het bepalen van gebieden met de hoogste risico's ('hot spots'), het ontwerpen van monitoringsprogramma's en het afleiden van vuistregels voor de toediening van de middelen aan de dieren en van mest aan de bodem. Het is echter wel nodig om voor diergeneesmiddelen de invoer en uitvoer van het model op een aantal punten aan te passen:

- Invoer van het model
- o Er moet vóór het invoeren van gegevens in GeoPEARL met de lotgevallen van de diergeneesmiddelen in mestkelders rekening worden gehouden.
- o In principe zouden alleen berekeningen uitgevoerd moeten worden voor plots waar de middelen ook echt terecht komen. Hiertoe moet voor mest de koppeling met het gewas gedeeltelijk worden losgelaten en een extra kaart worden geconstrueerd met gebieden waar mest uit een bepaalde veehouderijsector uitgereden wordt.
- Modelaanpassingen.
- o In het kader van realistische scenario's voor mest zouden mestinjectie en ploegen in combinatie doorgerekend moeten kunnen worden.
- Uitvoer van het model.
- o Uitvoer van de initiële concentraties ('PECinitial') in de toplaag van de bodem en het poriewater direct na toediening van mest.
- o Uitvoer van de ophoping in de toplaag van de bodem gedurende de toedieningsperiode van diergeneesmiddelen.

Daarnaast is het belangrijk om de uitkomsten van het onderliggende PEARL model te toetsen middels onderzoek in het veld.

### 3.3 Resistentieonderzoek

In deze studie werd is gekozen voor een veld benadering, waarbij drie bedrijven tijdens de periode van bemesting regelmatig werden bemonsterd ( vlak voor, en een dag, een week en vier weken na de bemesting). Op elk bedrijf werd in de nabijheid van de veldlocatie ook een referentielocatie gekozen, om de lange termijn effecten van bemesting te kunnen vergelijken met een soortgelijke, maar niet bemeste grond.

Resistentie werd onderzocht op twee manieren:

Ten eerste door resistentie in bacterie-isolaten te onderzoeken. Er werden E.coli bacteriën geïsoleerd, omdat E. coli een van de belangrijkste fecale indicatorkiemen is. Verder werden er ook bacteriën geïsoleerd die typisch zijn voor grond (oligotrofe en copiotrofe bacteriën). Ten tweede werd er resistentie onderzocht door DNA uit de grond te isoleren en daarin met behulp van real-time kwantitatieve PCR het resistentie gen sul2 kwantitatief aan te tonen.

E.coli werd in de referentiegronden nauwelijks aangetroffen, in overeenstemming met het voorkomen van E.coli in fecale bronnen. In de veldlocaties volgden de hoeveelheden van E.coli de te verwachten trend, met een toename na de bemesting. Deze gegevens bevestigen de hypothese dat mest een bron van fecale kiemen is. De groep van coliforme kiemen toonde geen duidelijk verband met bemesting, wat duidelijk maakt dat het aandeel aan milieugerelateerde bacteriën in de coliformen groter is dan het aandeel fecale kiemen. Het resistentiepatroon van E.coli en coliformen in de veldgronden was niet met de referentielocaties te vergelijken, omdat de gevonden aantallen aan multiresistente kiemen te laag waren om statistisch verantwoorde uitspraken te doen. In de milieubacteriën werd in allebei de gronden resistentie aangetoond. De tetracycline - en trimethoprim resistenties ( de meest voorkomende van de onderzochte resistenties) waren echter in allebei de veldgronden en de referentiegronden even groot. Er tredt dus blijkbaar geen uitwisseling van resistenties tussen de intestinale bacteriën in de mest en de met de hier gebruikte methode geïsoleerde bacteriën op. Omdat maar een klein percentage van alle bacteriën geïsoleerd kunnen worden, betekent dat echter niet dat principieel geen uitwisseling van genen tussen fecale kiemen en milieubacteriën mogelijk is. Toch kan geconcludeerd worden dat zowel E.coli als de milieubacteriën geen goede indicatoren vormen voor het optreden van resistentie in landbouwgronden.

De gen-analyses lieten duidelijke verschillen tussen de veldlocaties en de referentielocaties zien. De voor de totale DNA hoeveelheid in de DNA extracten gecorrigeerde resistentieniveaus van het sul2 gen (één van de drie bekende sulfonamide-resistentie genen) lagen voor de bemesting in de veldlocaties licht, maar significant hoger dan in de referentielocaties. De referentielocaties toonden verder een constant niveau van sul2 resistentie, dat vaak rond of beneden het detectielimiet lag. TetM was in de referentielocaties niet aan te tonen. In de veldlocaties steeg de hoeveelheid aan sul2 met de bemesting in alle drie locaties significant, om ongeveer een factor 10. De niveaus daalden vervolgens bij de latere bemestingen. Voor tetM konden alleen na bemesting meetbare hoeveelheden worden gevonden. De tetM gehalten in de veldmonsters volgden hetzelfde patroon als sul2. Deze waarden bevestigen dus de instroom van resistentie genen met de intestinale flora. De hier gevonden proportie van sul2 resistentie ligt in dezelfde orde van grootte als in een laboratoriumstudie, waarbij mest van een met sulfadiazine behandeld varken op grond uitgebracht werd. Onze veld waarnemingen bevestigen dus waarnemingen uit laboratoriumstudies. De analyses van het sulfonamide en tetraculine resistentie gen laten zien dat mest daadwerkelijk op veldniveau tot een stijging van het resistentieniveau kan leiden. De betekenis van dit feit voor de menselijke gezondheid is echter nog niet volledig bekend, omdat er weinig informatie beschikbaar is over de opname van resistentie genen via milieu en de uitwisseling van genetisch materiaal tussen de dragers van de resistentiegenen in het milieu en pathogenen die van belang zijn voor de menselijke gezondheid. Aanbevolen wordt hier nader onderzoek naar te verrichten.

### **3.4 Onderzoek van grondwater, bodem en mest**

De op diverse locaties verzamelde monsters grondwater, bodem en mest zijn onderzocht met LC-MS/MS op aanwezigheid van alle gangbare tetracyclinen, sulfonamiden en quinolonen. Voor de grondwatermonsters is het onderzoek gericht op het lage ng/l (ppt) niveau en voor de grond- en mestmonsters op het lage ppb niveau.

In de grondwatermonsters werden geen tetracyclinen aangetroffen. Wel werd een aantal sulfonamiden gedetecteerd. Dit betrof sulfamethoxazol, sulfadiazine en sulfamethazine (= sulfadimidine). In veel gevallen waren de gehalten lager dan de LOQ (1 ng/l). *(LOQ, grens waarvan af het gehalte met een acceptabele betrouwbaarheid kan worden bepaald)*

In een aantal bodemmonsters werden oxytetracycline en doxycycline, soms voorkomend in combinatie aangetoond, steeds met gehalten lager dan 1 µg/kg.

De onderzochte mestmonsters bevatten, conform de verwachting, hogere gehalten aan deze twee tetracyclinen en de belangrijkste metaboliet van oxytetracycline, het 4-epi-oxytetracycline. Ook werden lage gehalten aan tetracycline aangetroffen.

De sulfonamiden en quinolonen lieten een ander beeld zien. In de grondmonsters werd een aantal (zeer) lage gehalten aan sulfonamiden en quinolonen gezien. Vanwege de sterke interacties tussen de stoffen (met name de tetracyclinen en (fluoro)quinolonen) die moeilijk te verbreken zijn is het niet uit te sluiten dat de werkelijke gehalten hoger zouden kunnen liggen.

In mest viel met name de aanwezigheid van sulfadiazine op, naast een aantal quinolonen op laag niveau.

## 4. Conclusies en aanbevelingen

Deze pilotstudie naar antibiotica in de bodem richt zich op de vraag:

*Vormen de met mest in de bodem gebrachte antibiotica, de daaruit voortkomende metabolieten of de door stoffen in de mest beïnvloede bacteriën een probleem voor dier- en volksgezondheid (voedselketen, drinkwaterproductie, resistentieontwikkeling)?*

*Kort samengevat: is er een probleem?*

De studie heeft bestaan uit een viertal onderdelen: literatuurstudie, modellering van het gedrag van antibiotica in het grondwater en in de bodem met het model GeoPEARL, veld- en laboratoriumonderzoek naar gehalten antibiotica in mest, grond en grondwater en een veld- en laboratoriumstudie naar resistente bacteriën en resistentiegenen.

Het veld- en laboratoriumonderzoek is indicatief van aard en heeft bestaan uit veldmetingen op 3 landbouwbedrijven (2 in Noord-Brabant en 1 in Overijssel) en bemonstering van 8 peilbuizen uit het grondwatermeetnet van de provincie Drenthe.

Geconcludeerd wordt het volgende:

- op de onderzochte akkers komen hogere hoeveelheden van het resistentiegen voor sulfonamiden (sul2) voor dan op naastgelegen referentielocaties. Tevens is na bemesting sprake van een verdere toename van de hoeveelheid resistentiegenen; 4 weken na bemesting is de hoeveelheid resistentiegen nog steeds hoger dan vóór bemesting. Het gen tetM laat hetzelfde patroon zien. TetM is niet aangetoond op de referentielocaties en slechts in één van de drie bemeste akkers voorafgaande aan de mestgift.
- er zijn geen aanwijzingen gevonden voor verhoogde resistentie in *E. coli* en oligotrofe en copiotrofe bodembacteriën;
- in mest en grond van bemeste akkers zijn antibiotica uit de groepen tetracyclinen, sulfonamiden en quinolonen aangetoond;
- de gemeten gehalten in mest liggen ver boven LOQ, de gemeten gehalten in grond allen beneden LOQ.
- in het grondwater direct onder de grondwaterspiegel onder bemeste akkers zijn concentraties en sporen antibiotica en metabolieten aangetoond op het ng/l niveau (rond en beneden LOQ);
- in het provinciaal meetnet zijn in 4 peilbuizen nabij maïspercelen op 10 meter beneden maaiveld (m-mv) in al de vier watermonsters gehalten antibiotica aangetoond op niveau van minder dan 1 ng/l (beneden LOQ);
- in 4 bemonsterde peilbuizen in natuurgebieden zijn in drie monsters geen gehalten antibiotica aangetoond en is in één peilbuis een gehalte antibioticum aangetroffen van 1,3 ng/l (rond LOQ).

*LOQ: grens waarvan af het gehalte met een acceptabele betrouwbaarheid kan worden bepaald*

De gemeten concentraties in bodem en grondwater komen qua orde grootte overeen met de voorspelde waarden (GeoPEARL).

Aangezien vrijwel geen referenties beschikbaar zijn en in Nederland vrijwel geen ander veldonderzoek is verricht, is het niet mogelijk om een waardeoordeel te geven aan de aangetroffen meetwaarden. Het is gezien het indicatieve karakter van de studie eveneens niet mogelijk om aan te geven in hoeverre sprake is van een mogelijk probleem voor dier- en volksgezondheid.

Op basis van de conclusies van onderhavige pilotstudie wordt aanbevolen om het consortium en SKB een vervolgstudie te laten uitvoeren, gericht op het verzamelen van data en het uitvoeren van onderzoek naar het gedrag van dierlijke antibiotica in het milieu (transport, sorptie, biologische afbraak,...), de mogelijke overdracht van resistentiegenen van bacteriën in de bodem op mens en dier, en de mogelijke verstoring van ecosysteemdiensten van bodem en grondwatersystemen.

Specifiek voor beleidsmakers worden de volgende aanbevelingen gedaan:

- opschalen van het onderzoek en uitbreiden van het onderzoek naar de kans op overdracht van resistentie op bodemecosysteem, dier en mens. Op grond van dergelijk onderzoek kan vervolgens worden beoordeeld in hoeverre sprake is van potentiële risico's voor bodemecosysteem, dier- en volksgezondheid;
- onderzoek naar de effecten van antibiotica(residuen) op het natuurlijk milieu in de bodem, met het oog op eventuele aantasting van de ecosysteemfuncties van de bodem, zoals bodemvruchtbaarheid.
- Onderzoeken of bv antibiotica analyses in mest een instrument kunnen vormen om de effecten van het terugdringen van het veterinaire antibioticagebruik te monitoren (Convenant antibioticaresistentie dierhouderij).

Ten aanzien van vervolgonderzoek wordt aanbevolen (zie voor details ook de deelonderzoeken):

- analyseprogramma's voor mest-, grond-, grondwater, en drinkwatermonsters richten op de gangbare antibiotica in de groepen tetracyclinen, sulfonamiden en quinolonen en het in veel mengsels gebruikte trimethoprim (dit antibioticum is persistent, spoelt uit en heeft een relatief hoge halfwaardetijd);
- bepalen van de gevoeligheid van modellering voor halfwaardetijden;
- onderzoek naar adsorptie en afbraak als kernparameters om het gedrag van antibiotica in het milieu te kunnen beoordelen en voorspellen;
- voor het resistentieonderzoek wordt aanbevolen onderzoek te verrichten naar de uitwisseling van genetisch materiaal tussen de dragers van de resistentiegenen in het milieu en pathogenen die van belang zijn voor de menselijke gezondheid;
- verdere ontwikkeling van onderzoeksmethoden voor chemische analyses en resistentiemetingen;
- onderzoek naar de effecten van antibiotica op het bodemleven, inclusief micro-organismen en de door micro-organismen gedragen bodemprocessen en inclusief de interacties tussen micro-organismen en ander bodemleven zoals planten.

## **Bijlagen**

- A. Rapportage literatuuronderzoek
- B. Deelrapportage Uitspoelingsconcentraties en persistentie van antibiotica in de bodem berekend met het GeoPEARL 3.3.3 model
- C. Rapportage resistentieonderzoek
- D. Rapportage onderzoek van grondwater, bodem en mest



