

Rapportage deelresultaten project Antibiotica in de bodem

Titelblad:

SKB projectnummer: PP8348

Deelrapport: Antibiotica in de bodem: Resistentie in de bodem

Auteurs: Dr. Heike Schmitt (Institute for Risk Assessment Sciences (IRAS)-Universiteit Utrecht), Dr. Joost Lahr (Alterra – Wageningen UR), Gamonsiri Bhumibhamon (IRAS)

Datum: 20/11/2009

Samenvatting

Terwijl antibioticum-resistentie in ziekenhuizen en landbouwhuisdieren relatief goed onderzocht is, is veel minder bekend over het optreden van resistentie in het milieu. Een mogelijk belangrijke bron van resistentie in het milieu is het uitrijden van mest van intensief gehouden landbouwhuisdieren op landbouwgronden.

In deze studie werd een pilot-onderzoek verricht naar de rol van bemesting met varkensdrijfmest voor resistentie in zandige landbouwgronden. Er werd gekozen voor een veld-benadering, waarbij drie bedrijven tijdens de periode van bemesting regelmatig werden bemonstert (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 bemestte 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 ook bacteriën geïsoleerd die typisch zijn voor grond (oligotrofe en copiotrofe bacteriën). Ten tweede werd 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 en daardoor geen statistisch zinvolle getallen konden worden gewonnen. 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 landbouwgronden even groot. Er treed 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 kleine 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 *E. coli* nog de milieubacteriën een goede indicator voor het optreden van resistentie in landbouwgronden zijn.

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 tetracycline 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 het 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. Hier is verder onderzoek aanbevolen.

1. Inleiding

Korte beschrijving

Antibioticumresistentie in zowel ziekenhuizen als ook intensief gehouden landbouwhuisdieren is een bekend fenomeen en wordt zorgvuldig gemonitord. Over het optreden van antibiotica resistentie in het milieu is veel minder bekend. Eerste verkennende studies hebben resistente bacteriën of resistentie genen in aquatische milieucompartimenten zoals mesttanks, rivieren, afvalwaterzuiveringsinstallaties en grondwater aangetroffen (Chee-Sanford et al. 2001, Aminov 2002, Mackie et al. 2006, Pruden et al. 2006, Peak et al. 2007). Omdat de meeste antibiotica worden toegepast in ziekenhuizen en landbouwhuisdieren, is daar ook het niveau van resistentie vaak het grootst. Een belangrijke route van de verspreiding van resistentie vanuit landbouwhuisdieren is het uitbrengen van mest op landbouwgronden (Halling-Sorensen et al., 1998). Omdat *E. coli* bacteriën in varkens (naast vleeskalveren en kippen) hogere niveaus van resistentie uitwijzen dan melkkoeien (MARAN 2007), en omdat van deze drie diersoorten varkensmest het vaakst zonder behandeling van individuele bedrijven op akkers op wordt gebracht, werd gekozen voor varkenshouderijen.

Mest bevat een grote hoeveelheid intestinale bacteriën van landbouwhuisdieren. Uit verschillende onderzoeken blijkt dat deze flora ook resistente bacteriën of resistentiegenen kan bevatten (Binh et al. 2008), onder andere veroorzaakt door de toediening van antibiotica aan de dieren. Ook in bodem bevinden zich grote hoeveelheden bacteriën, waarvan een deel resistentiegenen draagt. Resistentie van bodembacteriën tegen antibiotica is een natuurlijk fenomeen. De verhouding tussen de natuurlijk voorkomende resistentie in bodem en de resistentie die door bemesting wordt toegevoegd is echter nauwelijks bekend. Verder zijn nog geen studies naar de rol van mest bij het voorkomen van resistentie in Nederlandse grond uitgevoerd. Onbekend is of de weinige uitgevoerde (laboratorium-)studies uit andere landen (Sengelov et al. 2003, Agerso et al. 2006, Schmitt et al. 2006) representatief zijn voor de Nederlandse situatie, die getypeerd wordt door intensieve veehouderij en een hoge bemestingsgraad (Tamis et al., 2008).

Voor onderzoek naar resistentie kunnen verschillende methodieken gebruikt worden, elk met hun eigen voor- en nadelen. Ten eerste kan resistentie in kweekbare bacteriën onderzocht worden. Het voordeel ervan is dat de bacteriestammen als geheel beter onderzocht kan worden, nadeel is echter dat slechts enkele van de vele duizenden soorten bacteriën die mogelijk in de monsters zouden kunnen voorkomen, gekweekt kunnen worden. In dit onderzoek werd gekozen voor *E. coli*, omdat deze kiem een indicatorkiem voor fecale belasting is, en omdat het resistentiepatroon van *E. coli* goed is onderzocht (MARAN 2005, MARAN 2007, SWAB 2005). Daarnaast werden bodembacteriën op hun resistenties onderzocht.

Omdat een groot deel van de bodembacteriën niet te kweken is, is een tweede methode gebruikt. Dit is gedaan door middel van een extractie van bacterieel DNA uit de bodem, en kwantitatieve bepalingen van het voorkomen van resistentiegenen in dit DNA. Met DNA-gebaseerde methoden kan een completer beeld van de hele microbiële gemeenschap in een bodemmonster verkregen worden. Het nadeel van deze methode is dat het resistentiegen niet meer gekoppeld kan worden aan een bacteriële 'host'. Omdat deze twee benaderingen verschillende aspecten van de onderzoeksvraag belichten, worden ze in dit onderzoek gecombineerd.

Doel / probleemstelling

In het deelproject antibioticumresistentie wordt onderzocht in hoeverre de toediening van mest kan leiden tot een toename van de (natuurlijke) resistentie in Nederlandse landbouwgronden. Dit wordt onderzocht door middel van onderzoek naar resistentie in *E. coli*, en door middel van kwantitatieve bepalingen van resistentiegenen in het DNA van de gehele bacteriële bodemgemeenschap, in bodemmonsters verkregen voor en na de jaarlijkse bemesting.

2. Beschrijving van de uitgevoerde werkzaamheden

2.1 Veldwerkzaamheden

Voor het onderzoek van belaste locaties werd gekozen voor de meest intensief bemeste zandgebieden in Nederland. Zandgebieden werden geselecteerd omdat in deze gronden vaak minder organische stof beschikbaar is aan die antibiotica kunnen sorberen. Daardoor zijn zandgronden een worst case voor mogelijke verontreiniging van het grondwater (ander deelproject). Gezien het indicatieve karakter van de studie diende de 'trekkan' zo groot mogelijk te zijn (worst-case gedachte). De gekozen gronden liggen in Oost-Brabant en Overijssel en worden gekenmerkt door zandige bodem en het gebruik van varkensmest uit intensieve veehouderij. Op de varkensboerderijen werden naar informatie van de eigenaren recent tetracycline- en sulfonamide antibiotica gebruikt, de totale hoeveelheden werden echter niet aangegeven. Voor elk van de gekozen locaties werd een referentie-locatie in de nabije omgeving geïdentificeerd. Deze dienden zo dichtbij als mogelijk te liggen (uitsluiten van effecten van ander bodemtype), maar niet bemest te worden. De referentiegronden werden tenminste tijdens de laatste 2 jaar niet bemest (waarschijnlijk veel langer, omdat de referentiegronden in twee van de drie situaties in bebost gebied lagen).

Het bemonsterings-schema was als volgt: 2-3 weken voor bemesting, 1 dag na bemesting en vervolgens 1 en 4 weken na bemesting. De monsters werden met behulp van een nematodenboor genomen. Van vier locaties in het veld werden elk 10 steekmonsters genomen op twee rijen (rechte lijnen), met een onderlinge afstand tussen de monsters van 1 m. De afstand tussen de vier rijen in één veld bedroeg 5 m. De 10 steekmonsters werden in het veld gemengd; dit wordt een 'subplotmonster' genoemd. Vervolgens werden delen van deze subplotmonsters in het veld tot één monster verenigd en gemengd; dit wordt 'mengmonster' genoemd. De monsters werden gekoeld vervoerd.

2.2 Laboratoriumwerkzaamheden

De monsteranalyse omvatte een combinatie van twee technieken, een moleculaire bepaling van resistentie in de totale bodem-microbiële gemeenschap, en een bepaling van resistentie in kweekbare *E. coli* bacteriën en milieubacteriën.

Ten eerste werd resistentie in kweekbare bacteriën onderzocht. *E. coli* werd gekozen als een indicatorkiem voor fecale flora. Daarnaast werd ook een kweektechniek gebruikt waarmee verschillende grondbacteriën geïsoleerd kunnen worden. Eerst werd de hoeveelheid van *E. coli* en milieubacteriën in de mengmonsters van elk locatie bepaald. Deze werkzaamheden werden binnen 12 uur naar monsternamen uitgevoerd. Daarvoor werden de bacteriën geëxtraheerd door 30 g bodem (natgewicht) met 30 ml 0.9% NaCl w/v 1 minuut in een blender te behandelen. Een reeks verdunningen van de extracten werd in viervoud ingezet op agar-isolatiemedië voor *E. coli* (selective *E. coli* / coliform chromogeen medium, Oxoid) en media voor de isolatie van copiotrofe (weinig nutriënten vragende) en oligotrofe (meer nutriënten vragende) milieubacteriën (volgens Semenov, 1999). De kolonies (kolonievormende eenheden, KFE) op de platen werden na 1 week incubatie (bij 20 graden, milieubacteriën) of 1 dag (bij 37 graden, *E. coli*) geteld. De presumptieve *E. coli* koloniën werden met een indool reactie bevestigd. Op het chromogeen medium werden naast *E. coli* ook coliforme bacteriën geteld, die zowel van fecale oorsprong kunnen zijn als ook in het milieu kunnen voorkomen. Uit deze tellingen werd de hoeveelheid bacteriën per gram grond berekend. De resistentie in deze bacteriën werd onderzocht door middel van isolatiemedië waaraan antibiotica werden toegevoegd. Voor *E. coli* werd een medium met een mengsel van meerdere antibiotica gebruikt om multiresistente *E. coli* aan te tonen (sulfamethoxazole – 512 $\mu\text{g ml}^{-1}$, tetracycline – 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$, trimethoprim – 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and streptomycin – 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Er werd voor een mengsel gekozen omdat de percentages van resistentie voor enkele antibiotica in *E. coli* zeer hoog kunnen zijn. Voor milieubacteriën werden platen met een enkel antibioticum (sulfamethoxazole – 512 $\mu\text{g ml}^{-1}$, tetracycline – 16 $\mu\text{g ml}^{-1}$, trimethoprim – 4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and streptomycin – 8 $\mu\text{g ml}^{-1}$) gebruikt. Door het tellen van bacteriën op isolatiemedië met en zonder antibiotica werd het percentage aan resistente isolaten bepaald. Ten slotte werd de vochtigheid van de gronden bepaald, om voor de veldvochtigheid te kunnen corrigeren.

Ten tweede werd moleculaire resistentie in de hele microbiële gemeenschap in de bodemmonsters onderzocht. Dit gebeurde door middel van een extractie van bacterieel DNA uit de bodem, en een kwantitatieve bepaling van het voorkomen van resistentiegenen in dit DNA door middel van real-time PCR

(polymerase chain reaction). De moleculaire analyses werden uitgevoerd met de subplot-monsters. Het DNA werd met behulp van het FastDNA spin kit for soil (Qbiogene) geëxtraheerd. Het gewonnen DNA werd door gel-electroforese op grootte gecontroleerd. De kwantitatieve real-time PCR reacties werden uitgevoerd met een Biorad IQ5 PCR apparaat. De PCR reacties werden in duplo uitgevoerd in een totaal volume van 20 µl en een commercieel PCR mastermix (Biorad IQ supermix). De primersequenties zijn als volgt:

gene	Sul2	16S
forward	tccggtggaggccggtatctgg	atggytgctcagctcgtg
backward	cgggaatgccatctgccttgag	gggtgctcgttc

Omdat mee-geëxtraheerde humuszuren de PCR reactie kunnen remmen, werden om te beginnen PCR reacties van verschillende verdunningen van het DNA ingezet om de laagste verdunning van het DNA zonder remming te bepalen (500x). In een subset van de monsters (monsternamen van 2 weken na bemesting) werd naar meerdere tetracycline- en sulfonamide-resistentiegenen gezocht. (sul2, tetM, tetS, en tetW). De meest voorkomende genen (sul2 en tetM) werd vervolgens in alle monsters bepaald. Er werd verder gecorrigeerd voor de hoeveelheid bacterieel DNA in de monsters door middel van normalisatie ten opzichte van een kwantitatieve PCR van het 16S gen, dat in elk bacterie voorkomt. Dit is nodig omdat de DNA extracties niet voor elk monster dezelfde absolute hoeveelheid DNA leveren. De kwantificatielimiet werd bepaald door een kwantitatieve PCR van een reeks van verdunningen van een bekende hoeveelheid DNA van een sul2 / tetM-dragende stam en een reeks van analyses van een blanco monster. De kwantificatielimiet werd vastgezet op de hoeveelheid die groter is dan 10 keer de standaardafwijking van het signaal van de blanco monsters. De kwantificatielimiet lag bij ongeveer 2 genen sul2 per PCR reactie. Na normalisatie komt het kwantificatielimiet uit op 1 sul2 gen per 30 000 bacteriële 16S genen. Voor tetM lag de kwantificatielimiet bij 10-100 genen per PCR reactie.

De data bestond uit vier waarnemingen per locatie en tijdstip (voor elk sublocatie een). Voor de statistische verwerking werden de verhoudingen van sul2 en tetM per 16S gen log-getransformeerd. Voor de statistische beoordeling van de data werden de waarden beneden het detectielimiet vervangen door het detectielimiet. Om het effect van de bemesting op de sul2 gehalten in de veldlocaties te toetsen (korte termijn effect), werd per locatie een one-way ANOVA van sul2 tegen het monstertijdstip met een Tukey post-hoc test doorgevoerd. Voor de vergelijking van de niveaus in de referentielocaties met het niveau in de veldlocaties voor de bemesting werden alle waarden in de referentielocaties gepoold en een nonparametrische test doorgevoerd (Mann-Whitney), omdat de niveaus in de referentielocaties vaak onder het detectielimiet lagen. De p waarden werden gecorrigeerd voor multiple vergelijkingen door middel van een Bonferroni-correctie (6 vergelijkingen: alleen p waarden <0.0083 werden als significant beschouwt). Voor tetM werden alleen de niveaus in de veldlocaties tussen de monstertijdstippen vergeleken, omdat de niveaus in alle referentielocaties en in de eerste bemesting van de veldlocaties beneden het detectielimiet lagen. Daarvoor werd de nonparametrische Behrens-Fischer toets met Bonferroni correctie (drie vergelijkingen) gebruikt. Alle analyses werden in het programma R doorgevoerd.

3. Resultaten

3.1 Resistentie in *E. coli*, coliformen en bodembacteriën

De hoeveelheden *E. coli* in mengmonsters van de onderzochte bedrijven zijn weergegeven in tabel 1 en figuur 1. In mest werden grote hoeveelheden *E. coli* en resistente *E. coli* gevonden.

De meeste grondmonsters toonden zeer lage aantallen van het fecale indicatorkiem *E. coli* (<10 kolonievormende eenheden *E. coli* op de agarplaat in de laagste verdunning). Bij deze lage aantallen is een preciese kwantificatie niet mogelijk (grote foutenmarge).

E. coli werd alleen incidenteel in de referentiemonsters aangetroffen, en alleen op het bedrijf OIJ (voor de bemesting) werden multiresistente *E. coli* gevonden (40/185=22%). In de veldmonsters volgen de hoeveelheden *E. coli* de bemesting: De grootste hoeveelheden werden gevonden direct na bemesting (OB1) of een week na de bemesting (OB2, OIJ1). Vier weken na de bemesting werden minder (OB2) of het minst (OB1, OIJ1) *E. coli* gevonden.

Het percentage multiresistentie in *E. coli* ten opzichte van de totale aantal *E. coli* kon in de referentiegronden niet bepaald worden omdat er te weinig *E. coli* gevonden werden (zie tabel 2). In de veldmonsters werden resistentiepercentages van 0-45% gevonden. Deze waarden zijn door de statistische onzekerheden bij lage totaal-aantallen van *E. coli* echter niet precies en kunnen alleen ter indicatie dienen (pas bij >20 kolonievormende eenheden per agarplaat of te wel 200 kolonievormende eenheden per gram grond zijn de getallen betrouwbaar). Duidelijk is dat multiresistente *E. coli* op elke veldlocatie werden aangetroffen.

Voor de coliforme bacterien werd een minder duidelijk patroon gevonden. Ten eerste werden coliforme bacterien ook in de referentiegronden in vergelijkbare hoeveelheden als in de veldgronden gevonden, en ten tweede had de tijd geen eenduidige invloed, in de veld noch in de referentielocaties. Wat betreft de multiresistente coliformen, kunnen net als bij *E. coli* geen conclusies aan worden verbonden, omdat de absolute aantallen zeer laag waren (alle gevonden waarden aan multiresistente coliformen zijn alleen indicatief, zie tabel 2).

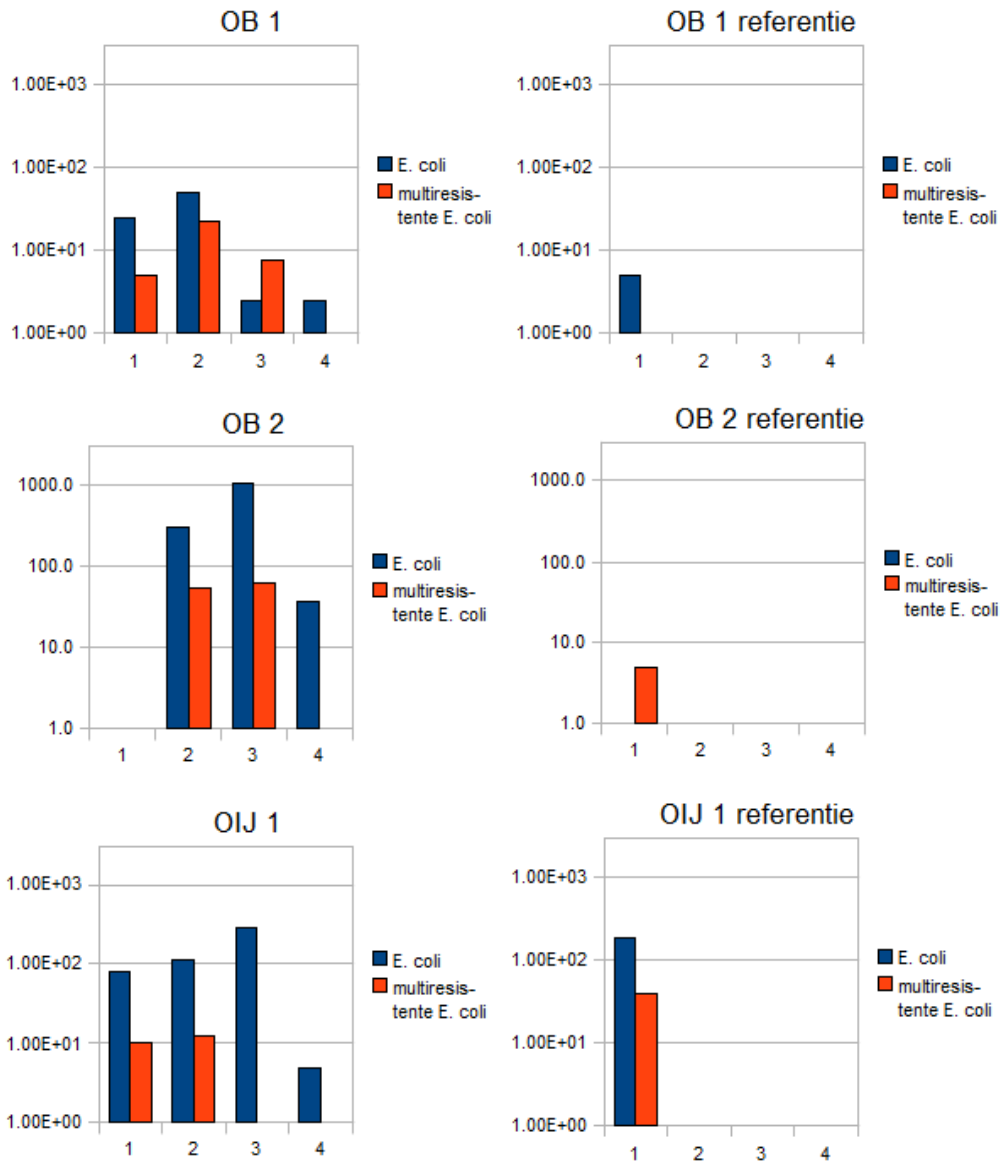
Tabel 1: Kolonievormende eenheden *E. coli* en multiresistente *E. coli* per gram bodem (drooggewicht) in mengmonsters van de drie bedrijven (in rood aangegeven: monsters beneden de kwantificatielimiet van 20 kolonies in de laagste verdunning)

monster	bemonstering	E.coli			multi resistant E.coli		
		OB1	OIJ1	OB2	OB1	OIJ1	OB2
referentie	1	5.0	185.0	0.0	0.0	40.0	0.0
referentie	2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
referentie	3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
referentie	4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
veld	5	25.0	80.0	0.0	5.0	10.0	0.0
veld	6	50.0	110.0	307.5	22.5	12.5	55.0
veld	7	2.5	275.0	1070.0	7.5	0.0	62.5
veld	8	2.5	5.0	37.5	0.0	0.0	0.0
mest		527500	12975	78750	270000	440	2975

Tabel 2: Kolonievormende eenheden coliforme bacteriën en multiresistente coliforme bacteriën per gram bodem (drooggewicht) in mengmonsters van de drie bedrijven (in rood aangegeven: monsters beneden de kwantificatielimiet van 20 kolonies in de laagste verdunning)

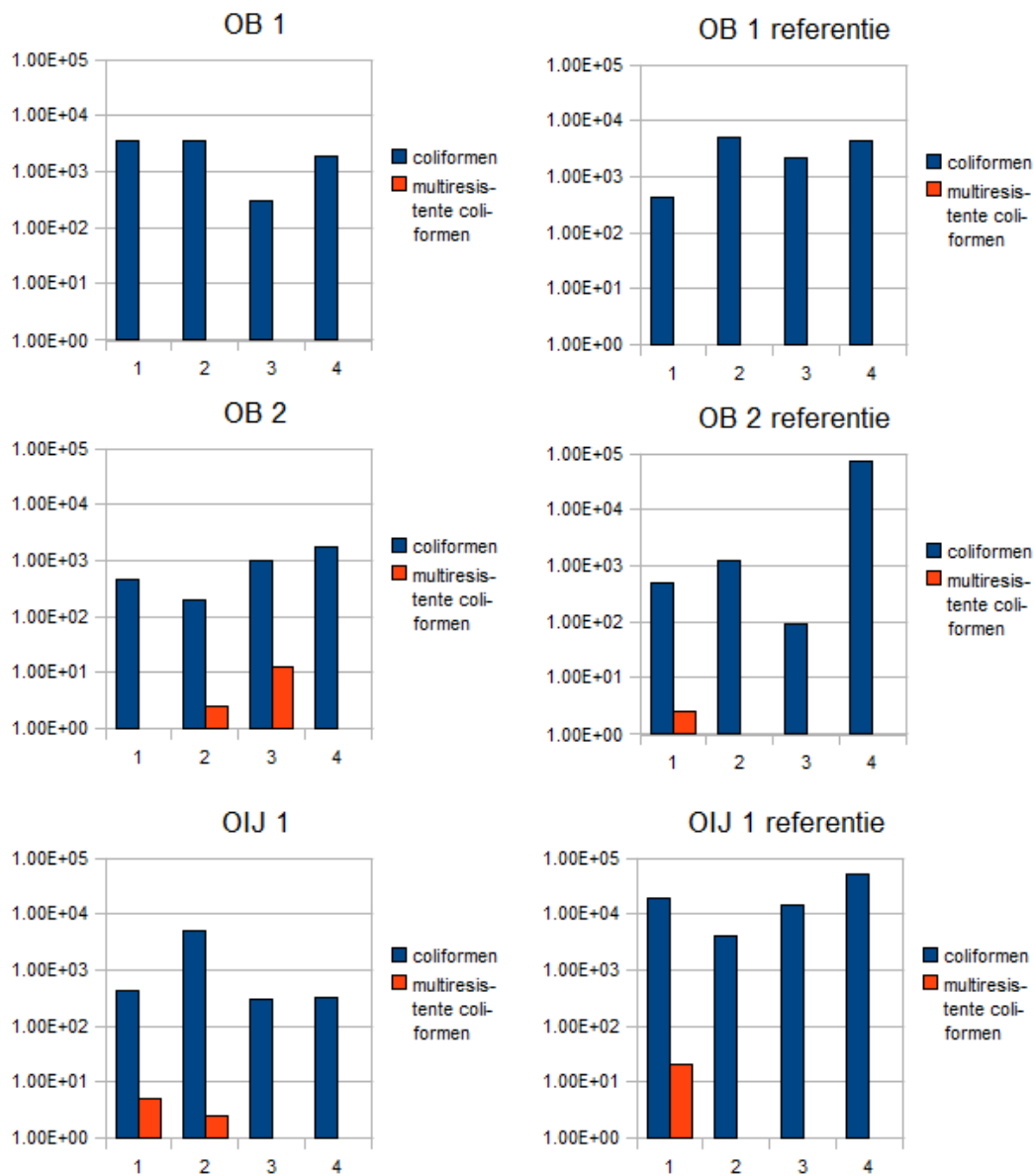
monster	bemonstering	coliformen			multiresistente coliformen		
		WRS	OLS	SCS	WRS	OLS	SCS
referentie	1	440.0	19500.0	510.0	0.0	20.0	2.5
referentie	2	5175.0	4225.0	1230.0	0.0	0.0	0.0
referentie	3	2275.0	14550.0	97.5	0.0	0.0	0.0
referentie	4	4550.0	56250.0	77750.0	0.0	0.0	0.0
veld	5	3550.0	450.0	462.5	0.0	5.0	0.0
veld	6	3700.0	5100.0	202.5	0.0	2.5	2.5
veld	7	310.0	317.5	997.5	0.0	0.0	12.5
veld	8	1940.0	340.0	1777.5	0.0	0.0	0.0
mest							

De hoeveelheden resistente bodembacteriën en totale bodembacteriën zijn weergegeven in figuur 3 en 4 voor de kweekbare copiotrofe (nutriëntenrijk agar) en oligotrofe (nutriëntenarm agar) bodembacteriën. De totale hoeveelheden liggen bij alle bedrijven rond de 10^7 oligotrofe en copiotrofe bacteriën / gram bodem (dw), alleen in het referentiemonster van bedrijf OIJ1 werden meer bacteriën gevonden. Het resistentiepatroon is voor alle bedrijven en voor alle tijdstippen ongeveer identiek. Tetracycline-resistentie en trimethoprim-resistentie werd doorgaans in alle bedrijven gevonden, de hoeveelheden aan sulfonamide- en streptomycine resistente bacteriën was op sommige locaties en tijdstippen lager. De resistentie-percentages lieten geen trend in de tijd zien, ook waren de percentages niet verschillend tussen de veldlocaties en de referentielocaties (figuur 2 en 3).

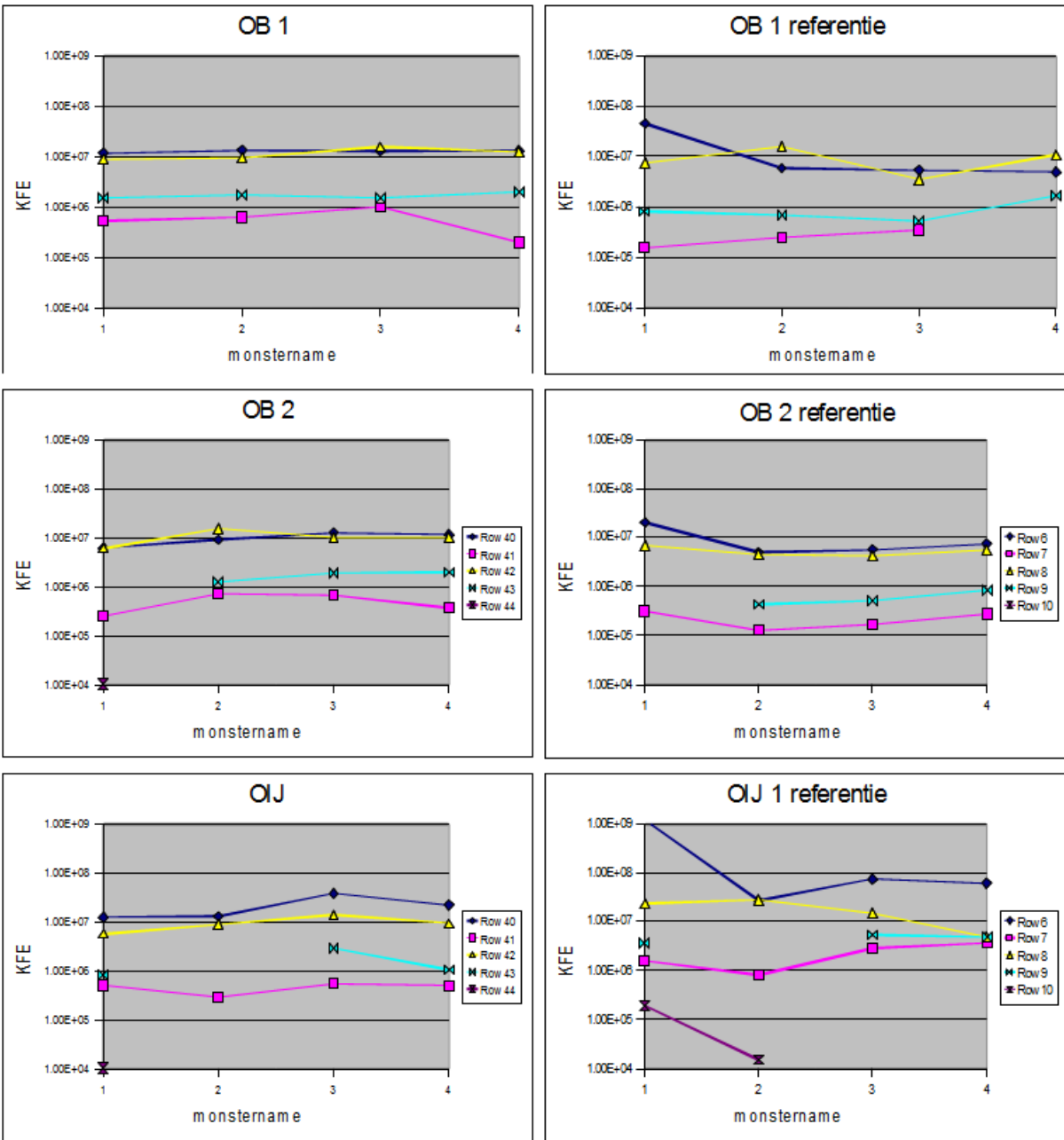


Figuur 1

Hoeveelheden *E. coli* en multiresistente *E. coli* in mengmonsters van de drie bedrijven. De hoeveelheden zijn aangegeven in kolonievormende eenheden van *E. coli* per gram grond (drooggewicht) per monsternummer (1: voor de bemesting, 2-4: na de bemesting). Het detectielimiet zijn 2.5 bacteriën per gram grond, ontbrekende balken hebben hoeveelheden kleiner dan dit detectielimiet.

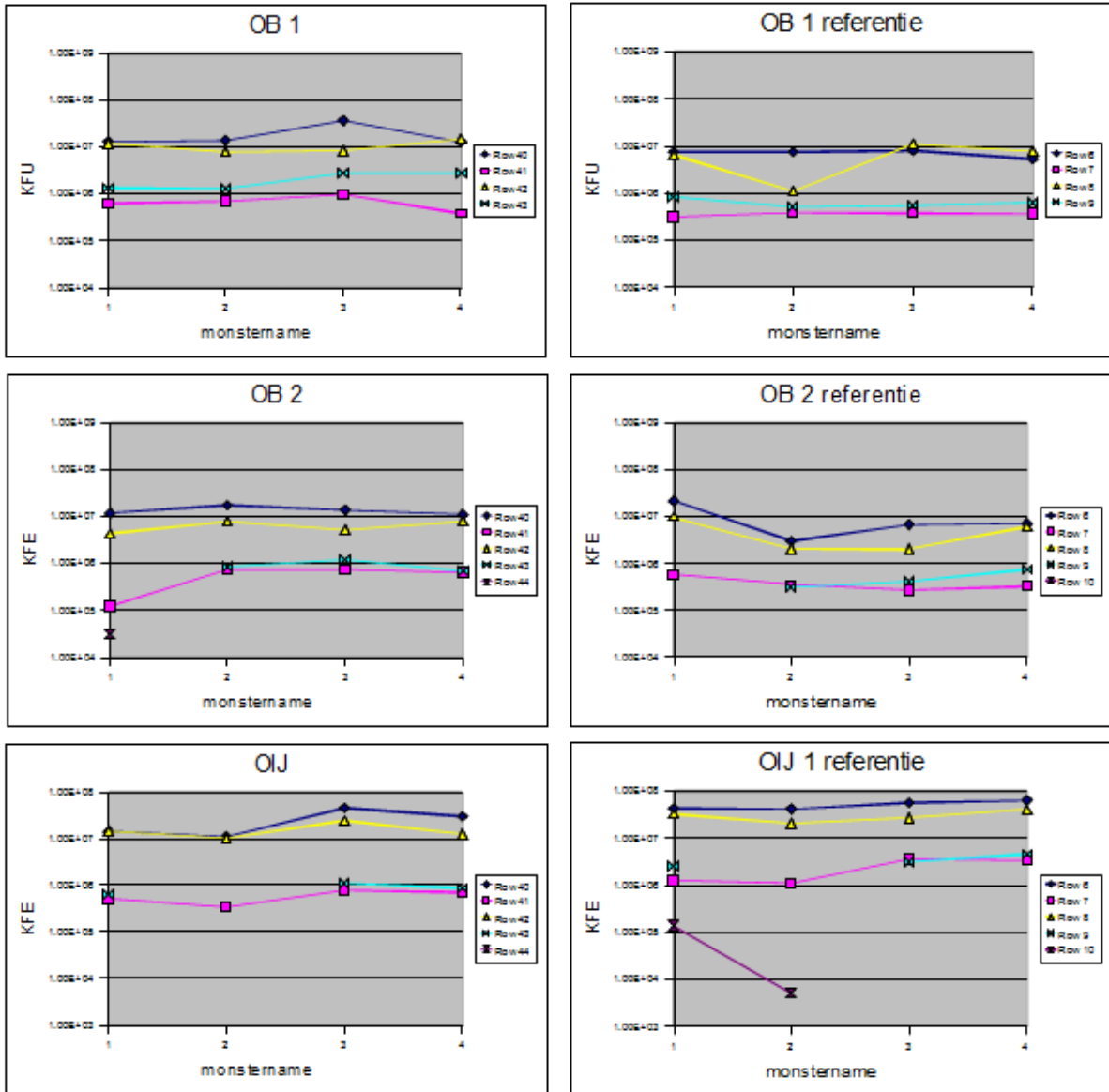


Figuur 2
 Hoeveelheden coliforme bacterien en multiresistente coliforme bacterien in mengmonsters van de drie bedrijven. De hoeveelheden zijn aangegeven in kolonievormende eenheden per gram grond (drooggewicht) per monsternamen (1: voor de bemesting, 2-4: na de bemesting). Het detectielimiet zijn 2.5 bacteriën per gram grond, ontbrekende balken hebben hoeveelheden kleiner dan dit detectielimiet.



Figuur 3

Hoeveelheden (resistente) copiotrofe bodembacteriën in mengmonsters van de drie bedrijven. De hoeveelheden zijn aangegeven in kolonievormende eenheden per gram grond (drooggewicht) per monstername (1: voor de bemesting, 2-4: na de bemesting). Blauw (rhomben): totale aantal bacteriën, roze (vierkantjes): tetracycline-resistente bacteriën, geel (driehoeken): trimethoprim-resistente bacteriën, lichtblauw (sterretjes): streptomycine-resistente bacteriën, paars: sulfonamide-resistente bacteriën.



Figuur 4

Hoeveelheden (resistente) oligotrofe bodembacteriën in mengmonsters van de drie bedrijven. De hoeveelheden zijn aangegeven in kolonievormende eenheden per gram grond (drooggewicht) per monstername (1: voor de bemesting, 2-4: na de bemesting). Blauw (rhomben): totale aantal bacteriën, roze (vierkantjes): tetracycline-resistente bacteriën, geel (driehoeken): trimethoprim-resistente bacteriën, lichtblauw (sterretjes): streptomycine-resistente bacteriën, paars: sulfonamide-resistente bacteriën.

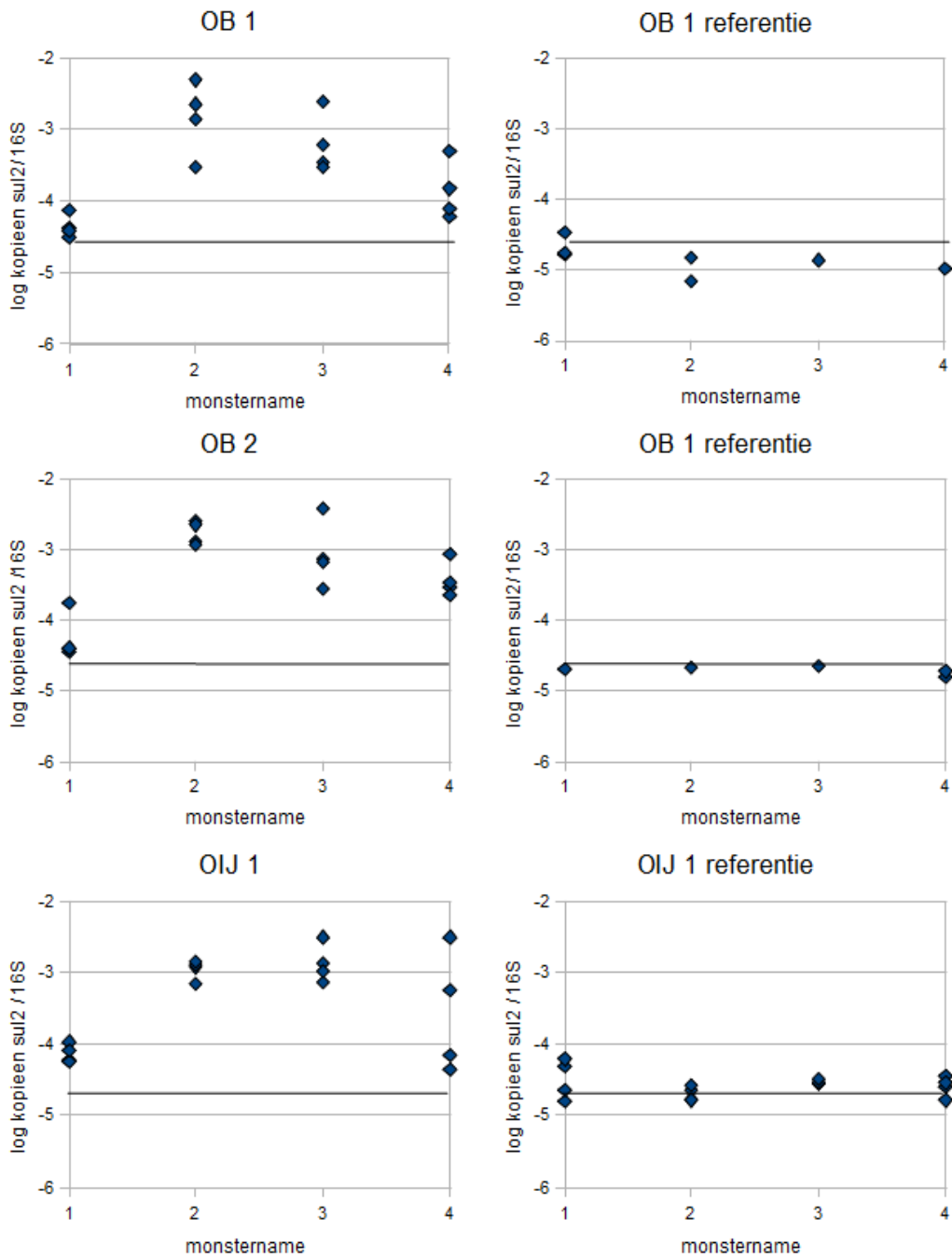
3.2 Resistentie-genen

In de mest werden de hoogste hoeveelheden aan resistentiegenen gevonden: voor sul2 -1.87 (OB1), -2.02 (OB2) en -1.76 (OIJ1) en voor tetM 0.45, 0.1 en 0.39. Deze waarden betekenen dat op elk 16S gen van de microbiële gemeenschap $10^{-1.87}$ (of te wel 0.013 of 1.3%) sul2 genen gevonden worden. Voor tetM worden op elk 16S gen 1-3 genen tetM gevonden, dus draagt een groot deel van alle bacteriën het tetM gen (een bacterie kan 2-14 16S genen dragen).

De waarnemingen van het sulfonamide resistentiegen sul2 in de subplots van de bedrijven zijn weergegeven in figuur 5. De hoeveelheden in de referentielocaties zijn in het algemeen lager dan in de veldlocaties en liggen rond de kwantificatielimiet (vaak werd het gen alleen in een deel van de subplots aangetoond). In de referentielocaties treedt er geen variatie in de tijd op. In alle drie de referentielocaties zijn de waarden ongeveer even hoog.

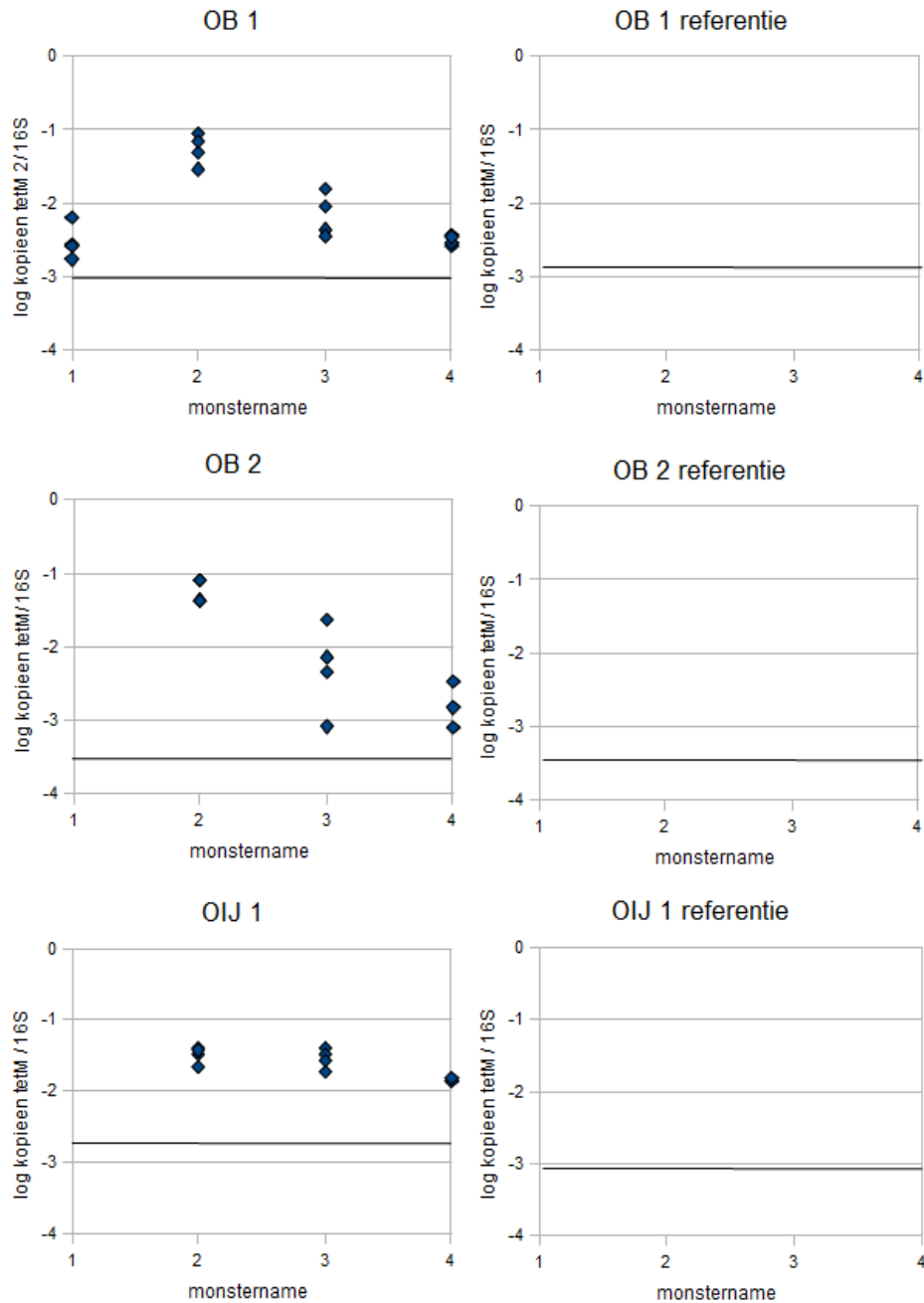
In de veldmonsters varieert de hoeveelheid aan sul2 in de tijd. De laagste hoeveelheden werden voor de bemesting gevonden. Direct na de bemesting (OB1, OB2) of een week na bemesting (OIJ1) stegen de hoeveelheden aan sul2 van ongeveer 1 op de 10.000 16S genen tot > 1 op de 1000 16S genen (meer dan factor 10). Dit effect was statistisch significant voor alle gronden op deze twee tijdstippen (met uitzondering van tijdstip 2 in locatie OJ1). Vier weken na bemesting waren de hoeveelheden doorgaans lager dan op de andere tijdstippen na de bemesting (met uitzondering van OIJ1, waar in twee van de vier percelen nog identieke hoeveelheden gemeten werden). De niveaus aan sul2 waren vier weken na de bemesting nog altijd licht hoger dan voor de bemesting, weliswaar was dit effect niet statistisch significant. Voor de bemesting werd significant meer sul2 aangetoond in de veldlocaties ten opzichte van de referentielocaties.

De waarnemingen van tetM, een van de meer dan 30 tetracycline resistentiegenen, is in figuur 6 weergegeven. TetM laat dezelfde trends zien als sul2. De gehalten in de referentiemonsters en in de eerste bemonstering van de veldlocaties lagen beneden de kwantificatiegrens, welke voor tetM hoger ligt dan van sul2. Uitgaand van de kwantificatiegrens namen de gehalten aan tetM na bemesting om een factor 10-100 toe. Dit effect was voor de bemonstering direct na bemesting significant en niet voor de andere bemonsteringen. Hier moest echter een nonparametrische toets gebruikt worden (omdat de waarden voor bemesting lager dan het detectielimiet waren), en deze hebben doorgaans een lagere statistische power dan parametrische tests.



Figuur 5

Hoeveelheden aan genkopieën van sul2 in submonsters van de drie bedrijven. Sul2 is een van de drie sulfonamide-resistentiegenen. De hoeveelheden zijn aangegeven in log genkopieën per gram grond (drooggewicht) per monstername (1: voor de bemesting, 2-4: na de bemesting). Er is genormaliseerd voor de hoeveelheid DNA in de extract door middel van normalisatie ten opzichte van het 16S gen.



Figuur 6

Hoeveelheden aan genkopieën van tetM in submonsters van de drie bedrijven. tetM is een van de >30 tetracycline-resistentiegenen. De hoeveelheden zijn aangegeven in log genkopieën per gram grond (drooggewicht) per monstername (1: voor de bemesting, 2-4: na de bemesting). Er is genormaliseerd voor de hoeveelheid DNA in de extract door middel van normalisatie ten opzichte van het 16S gen. De detectiegrenzen van een gemiddeld monster (individuele monsters hebben door verschillen in gehalte aan 16S verschillende detectiegrenzen) is door een horizontale streep aangegeven. In de referentiemonsters lagen de meeste waarden beneden de detectiegrens, in de veldmonsters gaven sommige monsters voor de bemesting waarden beneden de detectiegrens.

4. Evaluatie van de resultaten

4. 1. Resistentie in *E. coli*, coliformen en bodembacteriën

Het optreden van *E. coli* volgt de verwachtingen voor een kiem van fecale oorsprong. Ten eerste werd *E. coli* nauwelijks gevonden in de referentielocaties, en ten tweede toonde *E. coli* in de veldmonsters een maximum na de bemesting. Mest is dus de voornaamste bron van *E. coli* in de veldmonsters, wat ook bevestigd wordt door de aantallen van *E. coli* in de mest. Er werden op veel tijdstippen ook multiresistente *E. coli* in de veldlocaties aangetoond, terwijl alleen in twee referentielocaties op een tijdstip multiresistente *E. coli* werden gevonden. De totale hoeveelheden aan *E. coli* in de veld- en referentiemonsters waren echter zo laag dat er geen statistisch zinvolle vergelijking mogelijk is tussen het resistentiepatroon in de referentiemonsters en de veldmonsters. De resistentie-percentages kunnen om dezelfde reden ook niet worden vergeleken met de resistentie-percentages van veterinaire *E. coli* isolaten in Nederland (in *E. coli* geïsoleerd uit darmen van slachtvarkens werden in 2006/2007 volgende resistentie percentages gevonden: tetracycline 71.8%, sulfamethoxazol 54.4%, trimethoprim 49.6% en streptomycin 51.9%. Meer dan 20% van de isolaten dragen vier resistenties tegelijkertijd, hoewel onbekend is hoeveel daarvan de combinatie van de bovengenoemde meest voorkomende resistenties dragen (MARAN, 2007)).

De coliforme kiemen lieten geen duidelijk patroon zien: de gehalten in de veldmonsters waren niet hoger dan in de referentiemonsters, en de tijd had geen eenduidige invloed op de aantallen. Coliforme kiemen omvatten een groep van bacteriën die zowel van fecale oorsprong kunnen zijn (zoals *E. coli*) als ook in het milieu kunnen voorkomen (zoals *Citrobacter*). In dit geval is het waarschijnlijk dat er een zo groot aantal aan milieu-gerelateerde kiemen in de monsters aanwezig was, dat een mogelijke instroom van fecale coliformen met de mest niet zichtbaar werd. Over het resistentiepatroon van de coliformen is – net als bij *E. coli* – geen statistisch zinvolle uitspraak mogelijk.

De gevonden aantallen bodembacteriën, zowel de niet-resistente en de resistente, waren in grote mate constant. Er was geen invloed van de bemesting of het gebruik van de veldlocatie voor landbouw te zien. De resistentie voor de gekozen antibiotica lijkt dus niet in grote mate uitgewisseld te worden tussen de fecale flora in de mest en de bodembacteriën die met de gekozen isolatiemethode kunnen worden onderzocht. Omdat maar een klein deel van de tienduizenden soorten milieubacteriën gekweekt kan worden (1-10%), betekent het echter niet dat er in principe geen uitwisseling van genetisch materiaal tussen *E. coli* en milieubacteriën plaats kan vinden. Het zou kunnen zijn dat de milieubacteriën die met de hier gebruikte methodes werden geïsoleerd uit andere genera komen dan *E. coli* (een gram negatief bacterie uit de groep van de gamma-proteobacteriën), wat uitwisseling van genetisch materiaal minder waarschijnlijk maakt. Het is echter moeilijk te zeggen met welke stammen van bodembacteriën wel uitwisseling van genetisch materiaal plaats zou kunnen vinden, omdat over de meeste bodembacteriën niet voldoende bekend is.

Theoretisch zouden ook antibiotica residuen in de bodem resistentie in bodembacteriën kunnen opwekken. Dit is echter minder waarschijnlijk, omdat soortgelijke effecten pas bij veel hogere concentraties aangetoond konden worden dan in de veldgronden optreden (Heuer et Smalla, 2007).

Concluderend is op te merken dat *E. coli* noch decoliformen, oligotrofe of copiotrofe bacteriën goede indicatoren voor de belasting van landbouwgronden met antibioticaresistentie zijn. *E. coli* treed namelijk in te lage hoeveelheden op in niet-landbouwgronden, en in coliformen werd weinig multiresistentie gevonden. De tetracycline- en trimethoprimresistenties in bodembacteriën lijken niet beïnvloed te worden door de aanwezigheid van resistente *E. coli* of andere fecale kiemen.

4. 2. Resistentie-genen

In een verkennend onderzoek naar verschillende tetracycline- en sulfonamide genen trad *sul2* naast *tetW*, *tetM* en *tetS* het meest op. Dit is in overeenstemming met het feit dat sulfonamides tot de veelgebruikte antibiotica in Nederland behoren.

De niveaus aan sul2 lieten duidelijke verschillen tussen de referentielocaties en de veldlocaties zien: terwijl de niveaus in de referentielocaties laag en constant waren, leidde bemesting in de veldlocaties tot meer dan 10 keer hogere niveaus in alle drie onderzochte situaties. Na vier weken trad een daling van de sul2 hoeveelheden op. Verder werden in vergelijking met de referentielocaties ook hogere hoeveelheden sul2 in de monsters voor bemesting gemeten. De absolute hoeveelheden sul2 resistentiegenen liepen tussen de drie locaties niet veel uiteen.

Een verschil tussen de locaties was echter het tijdstip van het sul2 maximum: dit lag bij OIJ1 in tegenstelling tot OB1 en OB2 bij 1 week na de bemesting. Een reden zou kunnen zijn dat de bemonstering direct na de bemesting moeilijk te standardiseren is: de mest-injectielijnen zijn nog duidelijk aanwezig, en er is 1 dag na de bemonstering waarschijnlijk nog weinig menging van de grond tussen de injectielijnen met de mest opgetreden. Afhankelijk van hoeveel steekmonsters direct in een injectielijn genomen worden, kan dus het aandeel aan mest in het mengmonster variëren.

De in deze studie verkregen waarden zijn te vergelijken met een studie waar bodem behandeld werd met mest van een big na de toediening van een 'kuur' sulfadiazine (Heuer, 2008). In deze studie bevatte de mest een genormaliseerde sul2 hoeveelheid van ongeveer -2, en in de bodem werden waarden van -3.8 (direct na toediening) en rond -5 (10 en 20 dagen na bemesting) gevonden. Daarmee zijn de in Nederland gevonden waarden nog licht hoger dan de sul2 resistentie in de genoemde studie, maar in een vergelijkbare orde van grootte. Voor de in mest gevonden sul2 genen geldt dat in de Duitse studie net hogere concentraties aan sul2 gevonden werden (tussen -1 en -2 ten opzichte van rond -2 in onze studie).

Het gen tetM liet dezelfde patronen zien als sul2, met de uitzondering dat tetM in de referentiemonsters en in de eerste bemonstering van de veldmonsters meestal niet aantoonbaar was. Deze waarnemingen bevestigen dus de conclusies die voor sul2 getrokken werden. Op te merken is dat de gehalte van tetM in de mest hoger lag dan de gehalte van sul2.

5. Conclusies en aanbevelingen

In deze studie werd met behulp van kwantitatieve real-time PCR een duidelijke invloed van bemesting op het optreden van het sulfonamide resistentiegen sul2 en het tetracycline resistentiegen tetM gevonden. Bemesting leidde in alle drie locaties tot een stijging van de relatieve hoeveelheid van de genen (korte termijn effect). Dit was voor sul2 direct na en een week na bemesting significant, voor tetM direct na bemesting. Verder waren de hoeveelheden sul2 in de veldgronden vóór bemesting licht hoger dan in de referentiegronden. Dit is een mogelijk lange termijn effect. Samenvattend kan geconcludeerd worden dat genonderzoek een geschikt middel is om zowel korte- als lange termijn effecten van bemesting aan te tonen. Het is daarom aan te bevelen in toekomstig onderzoek de kwantificatie van resistentiegenen mee te nemen.

Op basis van deze studie kan geconcludeerd worden dat onderzoek naar het resistentiepatroon van de fecale indicatorkiem *E. coli* niet geschikt is om antibioticumresistentie in gronden zonder bemesting te onderzoeken, omdat er te weinig *E. coli* aantoonbaar zijn. Ook resistentie in coliforme bacteriën, en in oligotrofe en copiotrofe milieubacteriën was niet geschikt als indicator voor antibioticumresistentie, omdat er weinig verschil optrad tussen resistentie in veld- en referentiegronden. Deze met deze methode kweekbare bacteriën worden blijkbaar niet door de resistente fecale kiemen beïnvloed, op korte termijn (door de bemesting) noch op lange termijn (vergelijking veld – referentie voor de bemesting). De hoeveelheden *E. coli* in de veldmonsters waren echter in overeenstemming met de rol van de bemesting voor het optreden van fecale indicatoren: na de bemesting traden de maximaal gemeten hoeveelheden op.

De betekenis van een verhoging van niveaus van resistentiegenen voor de menselijke gezondheid of voor de bacteriële gemeenschap in landbouwgronden is nog moeilijk in te schatten. Ten eerste is niet bekend hoe groot de blootstelling van mensen aan genen in de grond is. Mogelijke routes van blootstelling zijn het inademen van stof in landbouwgebieden en consumptie van landbouwproducten, maar geen van deze routes is wetenschappelijk onderzocht. Bij het laatste zou sprake moeten zijn van een verhoogde

hoeveelheid resistentiegenen, waarbij de genen ook nog in de producten over moeten kunnen gaan. Van directe betekenis voor de menselijke gezondheid zijn resistenties alleen dan als ze gelocaliseerd zijn op pathogene bacteriën. Indirect zou de resistentie van pathogenen echter toe kunnen nemen als er meer bronnen voor resistentiegenen in het milieu aanwezig zijn. Met onderzoek naar genen in de totale microbiele populatie is het helaas niet mogelijk te onderzoeken welke bacterie de drager van de aangetroffen resistentiegenen is. De onderzoeken naar resistentie die tot nu toe zijn uitgevoerd hebben zich echter – net als dit onderzoek – beperkt tot een kwantificatie van genen of resistente bacteriën in verschillende milieucompartimenten. Een aanbeveling die uit dit onderzoek resulteert is dus dat er aanvullend onderzoek naar de overdrachtsroutes van resistentiegenen of resistente bacteriën van het milieu naar de mens nodig is.

Begrippenlijst

DNA desoxyribonucleine zuur – erfelijk materiaal

PCR polymerase chain reaction – techniek voor het vermenigvuldigen en aantonen van DNA

primer stuk DNA dat voor de specificiteit van de PCR reactie zorgt

Literatuur

Agerso Y, Wulff G, Vaclavik E, Halling-Sorensen B, Jensen LB. 2006. Effect of tetracycline residues in pig manure slurry on tetracycline-resistant bacteria and resistance gene tet(M) in soil microcosms. *Environ Int* 32(7):876-82.

Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Teferedegne B, Krapac IJ, White BA, Mackie RI. 2002. Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Applied and environmental microbiology* 68(4):1786-1793.

Binh CTT, Heuer H, Kaupenjohann M, Smalla K. 2008. Piggery manure used for soil fertilization is a reservoir for transferable antibiotic resistance plasmids. *FEMS Microbiology Ecology* 66(1):25-37.

Chee-Sanford JC, Aminov RI, Krapac IJ, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. 2001. Occurrence and diversity of tetracycline resistance genes in lagoons and groundwater underlying two swine production facilities. *Applied and environmental microbiology* 67(4):1494-1502.

Halling-Sørensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the Environment - a review. *Chemosphere* 36(2):357-393.

Heuer H et al. 2008. Fate of sulfadiazine administered to pigs and its quantitative effect on the dynamics of bacterial resistance genes in manure and manured soil. *Soil Biology and Biochemistry* 40:1892-1900

Heuer H, Smalla K. 2007. Manure and sulfadiazine synergistically increased bacterial antibiotic resistance in soil over at least two months. *Environmental Microbiology* 9(3):657-66.

Mackie RI, Koike S, Krapac I, Chee-Sanford J, Maxwell S, Aminov RI. 2006. Tetracycline residues and tetracycline resistance genes in groundwater impacted by swine production facilities. *Animal Biotechnology* 17(2):157-176.

MARAN, Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in The Netherlands In 2006/2007. 2007, CIDC: Lelystad

MARAN, Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in The Netherlands In 2005. 2005, CIDC: Lelystad

Peak N, Knapp CW, Yang RK, Hanfelt MM, Smith MS, Aga DS, Graham DW. 2007. Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology* 9(1):143-151.

Pei R., et al., Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Research*, 2006. 40(12): p. 2427-2435.

Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH. 2006. Antibiotic Resistance Genes as Emerging Contaminants: Studies in Northern Colorado. *Environmental Science and Technology* 40(23):7445 -7450.

Schmitt H., et al., Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils - microcosm and field studies. *Microbial Ecology*, 2006. 51: p. 267-276.

Semenov AM, van Bruggen AHC, Zelenev VV (1999) : Moving waves of bacterial populations and total organic carbon along roots of wheat, *Microbial Ecology* 37:116–128

Sengeløv G, Agersø Y, Halling-Sørensen B, Baloda SB, Andersen J, Jensen LB. 2003. Bacterial antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry. *Environment International* 28:587-595.

Smith M.S., et al., Quantification of tetracycline resistance genes in feedlot lagoons by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004. 70(12): p. 7372-7.

SWAB, NethMap 2006 – Consumption of antimicrobial agents and antimicrobial resistance among medically important bacteria in the Netherlands, H.A. Verbrugh and A.J. de Neeling, Editors. 2006, SWAB - Dutch Foundation of the Working Party on Antibiotic Policy: Amsterdam. p. 54.

Tamis, W.L.M., P.G.L. Klinkhamer, E. van der Meijden & J.A. van Veen. 2008. Potentiële effecten van diergeneesmiddelen op het terrestrische milieu in Nederland.

Bijlagen

Bijlage 1

Bemonsteringsdata en weercondities

farm		timepoint	date	temperature	Weather / cloudiness	wind
OB2	ref	1	20/04/2009	16-20	few clouds, sunny	no
	field			16-20		
	ref	2	29/04/2009	20	rain (moderate)	little wind
	field					
	ref	3	04/05/2009	9	clouds then sunny	little wind
	field					
	ref	4	25/05/2009	20	few clouds	Little wind,
	field			14-20	Very few clouds	little wid, at
OB1	ref	1	06/04/2009	18	clouds	no
	field			8-18	no clouds	no
	ref	2	08/05/2009	16	clouds	little wind
	field					
	ref	3	14/05/2009	25	no-sunny	little wind
	field					
	ref	4	05/06/2009	25	clouds	little wind
	field					
OIJ1	ref	1	07/04/2009	13	clouds	little wind
	field					
	ref	2	24/04/2009	20	no clouds – sunny	4-5 from So
	field					
	ref	3	01/05/2009	20	clouds	little wind
	field					
	ref	4	20/05/2009	25	no clouds – sunny	little wind
	field					

Bijlage 2

Bemestingsdata

farm	manuring	manure sampling	plowing
OB1	07/05/2009	08/05/2009	
OB2	28/04/2009	29/04/2009	30/04/2009
OIJ1	23/04/2009	24/04/2009	not clear since at 3rd sampling we still saw traces of our ground water drilling, but the farmer told us it had just been plowed – 4th time we did not see it