The background of the entire page is an abstract composition. It features several large, green, textured spheres that resemble pineapples or cacti. A large, thin white circle is superimposed over the center of the image, framing a smaller, reddish-brown textured sphere and a smaller green one. The background has a warm, golden-yellow, painterly texture.

DNA afbraak in mest

B. Molenaar, P.J.L. Derikx, T.W. Prins, H. Heskamp

WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

DNA afbraak in mest

B. Molenaar, P.J.L. Derikx, T.W. Prins, H. Heskamp

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Food Safety Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research, in opdracht van en gesubsidieerd door NVWA onder contractnummer 2033172.

Wageningen, januari 2022

WFSR-rapport 2022.002

WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Molenaar, B., Derikx, P.J.L., Prins, T.W., Heskamp, H., 2022. *DNA afbraak in mest*. Wageningen, Wageningen Food Safety Research, WFSR-rapport 2022.002. 14 blz.; 0 fig.; 3 tab.; 0 ref.

Projectnummer: 1207131101
Projecttitel: DNA afbraak in mest
Projectleider: P.J.L. Derikx

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/563169> of op <http://www.wur.nl/food-safety-research> (onder WFSR publicaties).

© 2022 Wageningen Food Safety Research, instituut binnen de rechtspersoon Stichting Wageningen Research. Hierna te noemen WFSR.

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van het WFSR is het niet toegestaan:

- a. *dit door WFSR uitgebrachte rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b. *dit door WFSR uitgebrachte rapport, c.q. de naam van het rapport of WFSR, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c. *de naam van WFSR te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

Postbus 230, 6700 AE Wageningen, T 0317 48 02 56, E info.wfsr@wur.nl, www.wur.nl/food-safety-research.
WFSR is onderdeel van Wageningen University & Research.

WFSR aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

WFSR-rapport 2022.002

Verzendlijst:

- P. Suijker, NVWA
- J.H. Noordsij, LNV

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Inleiding	7
2	Materialen & methoden	8
	2.1 Samenstelling van mestmonsters	8
	2.2 Procedure analyse DNA afbraak	8
	2.3 DNA isolatie	9
	2.4 qPCR analyse	9
3	Resultaten & discussie	10
	3.1 Samenstelling mestmonsters	10
	3.2 DNA afbraak	10
4	Conclusie	12

Samenvatting

WFSR voert jaarlijks duizenden analyses uit voor de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) om te ondersteunen bij de handhaving op wettige verplichtingen op het gebied van voedsel, diervoer en consumentenveiligheid. In voorkomende gevallen wil de NVWA uitsluitel hebben over de herkomst van mest. De vraag daarbij is of het aangetroffen DNA in het mestmonster overeenkomt met de opgegeven mestcode.

Dit onderzoek is uitgevoerd om een beter inzicht te krijgen in de afbraak van het DNA van het brondier als functie van de bewaartemperatuur. Het onderzoek is uitgevoerd met dagverse feces afkomstig van varkens en koeien. In dit onderzoek is aangetoond dat DNA van het brondier nog tot en met 12 maanden aangetoond kan worden indien de mest is opgeslagen bij 4 °C of 20 °C, 6 maanden indien opgeslagen bij 55 °C en één week indien opgeslagen bij 70 °C.

1 Inleiding

In verband met de geldende gebruiksnormen van dierlijke mest op landbouwgrond geldt dat leveranciers van dierlijke mest verplicht zijn om bij afvoer van dierlijke mest deze te laten bemonsteren en analyseren op het nutriënten gehalte. Bij afvoer en aanvoer wordt de beschikbare informatie vastgelegd op het Vervoersbewijs Dierlijke Mest (VDM) formulier. Op dit formulier moet onder anderen de mestcodes worden vermeld om aan te geven welk type mest er wordt aan- of afgevoerd.

De Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) handhaaft of deze formulieren inderdaad correct worden ingevuld. Het aantonen van dierlijk DNA in mest wordt gebruikt ter ondersteuning van uitspraken over de herkomst van de mest. Het aantonen van DNA is één van de manieren om uitsluitel te geven van welke soorten dier(en) de mest afkomstig is.

Dit onderzoek is uitgevoerd om inzicht te krijgen in hoe lang DNA aantoonbaar is in varkens- en rundveemest. De invloed van temperatuur op de DNA afbraak is bij dit onderzoek meegenomen, aangezien dit vermoedelijk de DNA afbraak versnelt en in de praktijk verhoogde temperaturen voorkomen bij vergisting en hygiënisatie van dierlijke mest.

2 Materialen & methoden

2.1 Samenstelling van mestmonsters

De monsters zijn genomen op 15-9-2020, het betreft in totaal vier monsters. De dieren maken deel uit van een veestapel van reguliere Nederlandse veebedrijven en zijn gevoerd met gangbare diervoeders.

Mestmonster	WFSR nr.	Herkomst
Varken-1	20-001856	Varken (drachtige zeug)
Varken-2	20-001857	Varken (drachtige zeug)
Rund-1	20-001858	Rund (droogstaande koe)
Rund-2	20-001859	Rund (melkgevende koe)

De mestmonsters zijn gekarakteriseerd door het vaststellen van de samenstelling. Hierbij zijn de droge stof (DS), organische stof (OS), stikstof (N), fosfaat (P) en kalium (K) bepaald volgens onderstaande NEN-normen.

Tabel 1 De toegepaste NEN-normen voor de bepaling van de mestsamenstelling van de mestmonsters

Bepaling	Monstervoorbewerking	Analysemethode	Uitgedrukt in g/kg
Totaal stikstof	NEN 7431:1998 & NEN 7433:1998	NEN 7434:1998	N
Totaal fosfor	NEN 7431:1998 & NEN 7433:1998	NEN 7435:1998	P ₂ O ₅
Droge stof	NEN 7431:1998	NEN 7432:1998	DS
Organische stof	NEN 7431:1998	NEN 7432:1998	OS
Kalium	NEN 7431:1998 & NEN 7433:1998	NEN 7436:1998	K ₂ O

2.2 Procedure analyse DNA afbraak

Na de monsternamen zijn de mestmonsters direct opgeslagen bij 4 °C. Van elk monster zijn vervolgens 7 sub-monsters per mestsoort bereid en bij elk van de onderstaande incubatieomstandigheden opgeslagen.

Behandeling nr.	Incubatie omstandigheden
1	Gekoeld bij 4 ± 3 °C
2	Kamertemperatuur ± 2 °C
3	Verwarmd op 55 ± 3 °C
4	Verwarmd op 70 ± 3 °C

De opslag bij verhoogde omgevingstemperaturen is meegenomen, omdat een temperatuur van 55 °C in de praktijk gebruikt wordt bij thermofiele vergisting van mest en 1 uur op 70 °C verwarmen toegepast wordt voor de verplichte hygiëniserende voorafgaand aan export van dierlijke mest.

Vervolgens is bij elk van de onderstaande tijdstippen één sub-monster van elke combinatie van mestsoort en behandeling ingevroren bij -20 °C om verdere afbraak van DNA te voorkomen.

Tijdstip	Incubatietijd
1.	1 dag
2.	3 dagen
3.	1 week
4.	3 weken
5.	6 weken
6.	6 maanden
7.	12 maanden

De ingevroren sub-monsters zijn verdeeld over twee series in behandeling genomen voor verdere DNA analyse. De eerste serie is na 6 weken in behandeling genomen. Hierbij is het DNA van de monsters van de eerste 5 tijdstippen (1 dag, 3 dagen, 1 week, 3 weken, 6 weken) geïsoleerd en geanalyseerd. De tweede serie is uitgevoerd na 12 maanden, daarbij is het DNA van de monsters van de laatste twee tijdstippen (6 maanden en 12 maanden) geïsoleerd en geanalyseerd.

2.3 DNA isolatie

Per tijdstip is er een set van 16 monsters (4 dieren x 4 behandelingen) en een extractie controle geïsoleerd gebruik makende van de Qiagen Qiamp fast stool mini kit en het protocol Isolation of DNA from Stool for human DNA analysis. De verkregen extracten zijn vervolgens 10x en 20x verdund voor uitvoering van de qPCR analyse.

2.4 qPCR analyse

In totaal zijn er 224 extracten (7 tijdstippen x 16 monsters x 2 verdunningen) exclusief positieve en negatieve controles met qPCR geanalyseerd.

Bij de analyse van de extracten is er eerst een controle uitgevoerd op aanwezigheid van amplificeerbaar DNA. Hierbij is 18S qPCR toegepast om vast te stellen of het DNA van voldoende kwaliteit is om verder te onderzoeken. Hiervoor is gekeken naar de Cq waarde. Hierbij geeft de Cq-waarde het aantal PCR-cycli weer waar het signaal boven de achtergrond uit komt. Op basis van de controles wordt een aantoonbaarheidsgrens (maximum Cq) vastgesteld, indien de gemeten Cq waarde boven de aantoonbaarheidsgrens ligt geeft dat aan dat de kwaliteit van het aanwezige DNA niet optimaal is.

Vervolgens is een qPCR uitgevoerd voor specifieke detectie van herkauwer- en varkens DNA (<https://www.eurl.craw.eu/legal-sources-and-sops/method-of-reference-and-sops/>). Voor de DNA oplossingen afkomstig van rundveemest geldt dat bij een Cq <38.06, herkauwer-DNA als aangetoond wordt beschouwd en indien hoger als niet aangetoond. Voor de DNA oplossingen van varkensmest geldt dat bij Cq <35.00, varken DNA als aangetoond wordt beschouwd en hoger als niet aangetoond.

Mestsoorten waarin bij de eerste meetserie al geen DNA meer wordt aangetroffen, zijn in de tweede meetserie niet meegenomen voor dat temperatuurregime.

3 Resultaten & discussie

3.1 Samenstelling mestmonsters

De gemeten samenstelling van de mestmonsters staat weergegeven in de onderstaande tabel:

Tabel 2 Samenstelling van de mestmonsters in g/kg

Mestmonster	Droge stof	Organische stof	N	P ₂ O ₅	K ₂ O
Rund-1	128	114	3,99	1,83	0,63
Rund-2	106	92	3,23	1,03	1,23
Varken-1	234	196	5,72	7,82	2,58
Varken-2	291	240	7,15	10,8	4,49

De gemeten samenstelling zoals weergegeven in Tabel 2 ligt in de orde van grootte van de overeenkomstige forfaitaire waarden voor deze mestsoorten.

3.2 DNA afbraak

De volgende visuele waarnemingen zijn gedaan bij de DNA-isolatie. Na 3 en 6 weken was er schimmelgroei zichtbaar op de mest in de buizen die bij 55 °C waren opgeslagen. Daarnaast was na 6 maanden bij 20 °C was er één mestmonster die schimmelgroei vertoonde. Na 3 weken of langer bij 70 °C of 6 maanden of langer bij 55°C was al het vocht uit de mest monsters verdampt. Uit volledig ingedroogde mest is het niet mogelijk DNA van goede kwaliteit te isoleren. Dit blijkt ook uit de 18S qPCR resultaten die voor deze monsters zijn verkregen. De monsters die tot 6 weken bij 70 °C opgeslagen waren bevatten nog amplificeerbaar DNA, echter ligt de gemeten Cq-waarde rond de vastgestelde aantoonbaarheidsgrens, wat aangeeft dat de kwaliteit niet optimaal is. Na opslag bij 55 °C bevatten de mestmonsters tot 6 weken nog voldoende amplificeerbaar DNA en na opslag bij 4 °C en 20 °C tot minimaal 12 maanden.

De resultaten van de herkauwer- en varkens-specifieke qPCR zijn samengevat in Tabel 3. Deze resultaten laten zien dat bij 4 °C en 20 °C het DNA van het brondier na 12 maanden nog steeds aantoonbaar is. Als mest is opgeslagen bij 55 °C is het DNA tot 6 weken aantoonbaar en bij 70 °C is dit tot minimaal 1 week na opslag.

Na 3 weken opslag bij 70 °C is het DNA nog net aantoonbaar in één van de twee rundvee mestmonsters (Cq = 36.47 en 37.30, respectievelijk 10 en 20x verdund), echter liggen deze waarden tegen de aantoonbaarheidsgrens (herkauwer Cq <38.06). Bij de andere monsters is het DNA na deze opslag condities niet meer aantoonbaar.

Na 6 weken bij 70°C is zowel het DNA van het varken als rund niet meer aantoonbaar door DNA-afbraak. Daarnaast is voornamelijk bij de rundvee mestmonsters te zien dat na 6 weken bij 55 °C, de Cq hoger is dan bij opslag bij 4 °C en 20 °C. Dit geeft aan dat dat DNA bij verhoogde temperatuur sneller wordt afgebroken.

Na 6 en 12 maanden opslag bij 4 °C en 20 °C zijn de Cq-waarden voor DNA in rundveemest nog ruimschoots onder de aantoonbaarheidsgrens. Voor varkens DNA zien we dat de gemeten Cq waarden (35.15 en 35.37, respectievelijk 10 en 20x verdund) voor één van de varkens de aantoonbaarheidsgrens (Varken Cq <35,00) overschrijdt na 6 maanden bij 20 °C. Echter zijn de gemeten Cq-waarden na 12 maanden bij 20 °C voor zowel varken-1 als varken-2 weer onder de aantoonbaarheidsgrens. Na zowel 6 als 12 maanden bij 55 °C zijn de Cq-waarden boven de aantoonbaarheidsgrens en kan het DNA dus niet meer worden aangetoond.

Tabel 3 *Overzicht resultaat aantoonbaarheid varkens en rundvee DNA in feces met diersoort specifieke qPCR onder verschillende bewaarcondities*

Rund	Incubatietijd						
Temp.	1 dag	3 dagen	1 week	3 weken	6 weken	6 maanden	12 maanden
70 °C	+	+	+	+/-	-		
55 °C	+	+	+	+	+	-	-
20 °C	+	+	+	+	+	+	+
4 °C	+	+	+	+	+	+	+

Varken	Incubatietijd						
Temp.	1 dag	3 dagen	1 week	3 weken	6 weken	6 maanden	12 maanden
70 °C	+	+	+	-	-		
55 °C	+	+	+	+	+	-	-
20 °C	+	+	+	+	+	+/-	+
4 °C	+	+	+	+	+	+	+

+	DNA in beide monsters angetoond
+/-	DNA in één van de twee monsters aangetoond
-	DNA in geen van beide monsters aangetoond

4 Conclusie

In dit onderzoek is waargenomen dat varkens DNA en herkauwer DNA aantoonbaar is tot en met:

- één week indien opgeslagen bij ≤ 70 °C;
- 6 weken indien opgeslagen bij ≤ 55 °C;
- minimaal 12 maanden indien opgeslagen bij ≤ 20 °C.

De omgevingstemperatuur speelt een belangrijke factor bij het de degradatie van DNA. Bij een verhoogde temperatuur wordt het DNA sneller afgebroken. Daarnaast draagt uitdroging van het materiaal sterk bij aan de degradatie van het DNA.

Op basis van dit onderzoek kan gesteld worden dat het type mest na thermofiele vergisting van enkele weken (tot maximaal 6 weken) bij 55 °C of na hygiënisatie (1 uur bij 70 °C) waarschijnlijk nog steeds vastgesteld kan worden op basis van aanwezig varken en/of herkauwer DNA.

Wageningen Food Safety Research
Postbus 230
6700 AE Wageningen
T 0317 48 02 56
wur.nl/food-safety-research

WFSR-rapport 2022.002

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

To explore
the potential
of nature to
improve the
quality of life

Wageningen Food Safety Research
Postbus 230
6700 AE Wageningen
T 0317 48 02 56
wur.nl/food-safety-research

WFSR-rapport 2022.002

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.800 medewerkers (6.000 fte) en 12.900 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.