

De rol van transmissieroutes water en mest bij besmetting van groente en fruit productiesystemen met humaan pathogene bacteriën

Rapportage TKI T&U project ‘transmissie humaan pathogenen’, TU18096

Leo van Overbeek, Carin Lombaers, Harold Meijer, Leo Poleij, Patricia van der Zouwen

Samenwerkende partners:

Land en Tuinbouw Organisatie (LTO), Stichting Teelt Overleg Groenten (TOG), Vereniging Biohuis, GroentenFruit Huis, Nederlandse Fruittelers Organisatie (NFO), Food Compass en Stichting Wageningen Research, onderdeel van WUR.



Samenvatting

Mest en irrigatiewater worden gezien als belangrijke bronnen van besmetting voor planten met humaan pathogene bacteriën tijdens gewasteelten. Besmettingen van planten met humaan pathogene bacteriën is vooral relevant voor gewassen waarvan de oogstbare producten, waaronder bepaalde soorten groenten, bladgewassen, kruiden en fruit, vers worden geconsumeerd. Het doel van dit project was om de transmissieroutes van humaan pathogene bacteriën vanuit mest en irrigatiewater naar gewassen te volgen en daarbij aanbevelingen te doen richting praktijk om risico's op besmettingen van oogstbare producten op individueel bedrijfsniveau beter te kunnen inschatten. In dit project zijn gegevens verzameld afkomstig van praktijkpercelen waarop (vers-consumeerbare) groenten en fruit worden geteeld en van veldproeven waarbij de transmissie van *Escherichia coli* en een geïntroduceerde *E. coli* stam als indicator bacterie via mest en irrigatiewater naar vers-consumeerbaar gewassen (sla en andijvie) werd gevolgd. Geïntegreerde gegevens uit alle experimenten gaven een overzicht over prevalenties en dichtheden van relevante humaan pathogene bacteriën, waaronder Shigatoxine-producerende *E. coli* (STEC), *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (*S. enterica*), *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) en *Listeria monocytogenes* en de *E. coli* indicator stam op kritieke punten (mest, bodem, rhizosfeer, water en planten) in de primaire plant productieketen. Relatief korte wachttijden van 45 tot 56 dagen tussen bemesting en oogst, zoals toegepast in experimenteel onderzoek, leidde tot prevalenties van 17 (achtergrond *E. coli*) en 10% (*E. coli* indicatorstam) in sla-rhizosfeer. Prevalenties en dichtheden van beide *E. coli* populaties in slakroppen waren laag en in de meeste gevallen niet gerelateerd aan toepassing van dierlijke meststoffen. Volledige overdracht van humaan pathogene bacteriën via de route van mest, bodem, rhizosfeer naar de (vers-) consumeerbare delen van de plant werd niet aangetoond bij de bedrijfsmonitoring en ook niet met behulp van de *E. coli* indicator stam, aangebracht in mest in 17 – 547 maal hogere dichtheden ten opzichte van de natuurlijk aanwezige *E. coli*. Het is daarmee aangetoond dat de aanbevolen wachttijd van 60 dagen in de GLOBALG.A.P. richtlijnen afdoende is om de kans op microbiële overdracht vanuit mest naar vers-consumeerbare delen van gewassen aanvaardbaar laag te houden. Verder kent de afname van *E. coli*, éénmalig aangebracht via irrigatiewater op het gewas (andijvie), een bimodaal verloop. Snelste (lineaire) afname vond plaats in de eerste drie dagen na irrigatie. Een belangrijke aanbeveling richting praktijk is om een interval periode van drie dagen aan te houden tussen irrigatie en oogst om daarmee

risico's op besmettingen van (vers) consumeerbare delen van gewassen met humaan pathogene bacteriën te reduceren.

Summary

Manure and irrigation water are often considered as relevant sources for contamination of plants with human pathogenic bacteria during crop production. Contamination of arable plants is specifically relevant for those crops whose products can be consumed freshly, such as particular types of vegetables, leafy greens, herbs and fruit. The objective of this study was to follow the transmission routes of human pathogens from manure and irrigation water to crops and to provide practical recommendations to end users for better assessment of risks on microbial contaminations of harvestable products in their management practices. In this project, data was collected from (freshly consumable) vegetable- and fruit-production fields and from experimental field sites where the transmission of *Escherichia coli* and an introduced *E. coli* strain, as indicator bacterium, were followed via manure and irrigation water to freshly consumable crops (lettuce and endive). Integrated data from all experiments provided an overview on prevalence and densities of relevant human pathogens, such as Shigatoxine-producing *E. coli* (STEC), *Salmonella enterica* subspecies *enterica* (*S. enterica*), *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) and *Listeria monocytogenes* and the *E. coli* indicator strain at critical points (manure, soil, rhizosphere, water and plants) in the primary plant production chain. Relatively short time interval periods of between 45 and 56 days between manure application to field soil and harvest, as performed at the experimental field site, resulted in prevalences to up to 17% for *E. coli* and to 10% for the *E. coli* indicator strain in lettuce rhizosphere soil. Prevalences and densities of both *E. coli* populations were low in lettuce heads and in most cases not related to the application of animal manure. Complete transmission of human pathogens via the route of manure, soil, rhizosphere to consumable parts of plants was never demonstrated and also not with the *E. coli* indicator strain, applied to manure at 17 – 547 times higher densities than the natural *E. coli* population. An interval period of 60 days, as recommended in the GLOBALG.A.P. guidelines, is therefore shown to be adequate to maintain risks on microbial transmission from manure to fresh-consumable parts of vegetables and fruit at acceptable levels. Further, the *E. coli* density, applied on the leaf surface of crop plants (endive) via a single overhead irrigation event, showed a bimodal decline. Fastest linear decline took place within the first three days after application. An important practical recommendation was to introduce a time interval period of three days between overhead irrigation and harvest to reduce risks on contamination of (freshly) consumable parts of crops with human pathogenic bacteria.

© 2024 Wageningen Plant Research, BU Bio-Interacties en Plantgezondheid, Wageningen University & Research

leo.vanoverbeek@wur.nl

Wageningen University & Research aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van de uitgever of auteur.

DOI: 10.18174/661014 (<https://doi.org/10.18174/661014>)

Inhoudsopgave

| | |
|--|----|
| Gebruikte afkortingen | 7 |
| 1 Inleiding | 9 |
| 2 Uitvoering van veldmonitoring en experimenten in het laboratorium en in proefvelden | 11 |
| 2.1 <i>Mest, bodem, water en gewasmonitoring van teeltbedrijven</i> | 11 |
| 2.2 <i>Gesimuleerde overdracht van humaan pathogene bacteriën via mest naar planten en overleving in mest onder experimentele omstandigheden</i> | 12 |
| 2.3 <i>Gesimuleerde overdracht van humaan pathogene bacteriën via irrigatiewater naar planten onder experimentele omstandigheden</i> | 13 |
| 3 Resultaten bedrijfsmonitoring, laboratorium en veldexperimenten | 14 |
| 3.1 <i>Bedrijfsmonitoring naar overdracht van humaan pathogene bacteriën via mest en mogelijk water naar planten</i> | 14 |
| 3.2 <i>Overdracht van de E. coli indicatorstam via mest naar gewassen onder experimentele omstandigheden</i> | 18 |
| 3.3 <i>Overleving van de E. coli indicatorstam op andijvie bladeren en de rhizosfeer na éénmalige irrigatie</i> | 19 |
| 4 Discussie en onderbouwing van de GlobalGAP vs 6 richtlijnen op basis van verkregen onderzoeksgegevens | 24 |
| 4.1 <i>Evaluatie van risico op overdracht van humaan pathogene bacteriën via mest naar vers-consumeerbare delen van gewassen</i> | 24 |
| 4.2 <i>Evaluatie van risico op overdracht van humaan pathogene bacteriën via irrigatiewater naar vers-consumeerbare delen van gewassen</i> | 27 |
| 5 Conclusies en aanbevelingen vanuit dit onderzoek | 30 |
| 5.1 <i>Conclusies</i> | 30 |
| 5.2.1 <i>Aanbevelingen voor verder onderzoek</i> | 31 |
| 5.2.2 <i>Aanbevelingen voor de praktijk</i> | 32 |
| Referenties | 33 |
| Bijlage | 35 |

Gebruikte afkortingen

A-Ec, Achtergrond *Escherichia coli*

B, Biologisch geteelde groente en fruit

Biol RM, Biologische rundermest

BOK, Bokashi

Cham, Champost

DNA, Desoxyribonucleïnezuur (Deoxyribonucleic Acid), erfelijk overdraagbaar materiaal waarop moleculaire detectie is gericht.

eae, Intimine gen, karakteristiek voor pathogene *E. coli*.

Ec, *Escherichia coli*/ *E. coli*

ehxA, Enterohemolysine gen, karakteristiek voor pathogene *E. coli*.

GLOBALG.A.P (versie 6), Wereldwijde standaard voor goede agrarische productie, in dit kader voor verse groente en fruit

GM, Geitenmest

I-Ed, Indicator *Escherichia coli* stam (0611)

invA, Invasine gene, karakteristiek voor *S. enterica*

KM, Kippenmest

Kve, Kolonievormende eenheden

Lm, *Listeria monocytogenes*/ *L. monocytogenes*

NPK, Minerale mest (stikstof, fosfor, kalium)

RDM, Runderdrijfmest

RM, Rundermest

SE, *Salmonella enterica*/ *S. enterica*

ST, *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium/ *S. Typhimurium*

STM, Gen dat codeert voor een faageiwit, in combinatie met *invA* karakteristiek voor *S. Typhimurium*.

stx, Shigatoxine genen, karakteristiek voor STEC.

STEC, Shigatoxine-producerende *Escherichia coli*

VDM, Varkensdrijfmest

1 Inleiding

Planten kunnen besmet raken met humaan pathogene bacteriën. Vooral planten waarvan de producten ongekookt (vers) kunnen worden geconsumeerd zoals sommige soorten groenten, bladgewassen, fruit en kruiden zijn gevoelig voor besmettingen met humaan pathogene bacteriën. De belangrijkste besmettingsroutes naar de plant zijn dierlijke mest [1, 2], na toevoeging aan de bodem, en water dat wordt gebruikt voor irrigatie [3, 4]. Daarnaast speelt hygiëne (persoonlijke hygiëne, hygiëne op het productieveld, dieren/ dierlijke ontlasting, afval/ mesthopen) en hygiëne van apparatuur (gereedschap, voertuigen, oogstapparatuur, lopende banden) een belangrijke rol. De meest relevante humaan pathogene bacteriën die worden gedetecteerd op levensmiddelen van plantaardige herkomst zijn zoönotisch, dat wil zeggen dat deze pathogenen van dieren afkomstig zijn, en vaak behoren tot de taxonomische groepen *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subspecies *enterica*, *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) en *Listeria monocytogenes*.

Het bedrijfsleven, vooral supermarktketens, hebben richtlijnen (GLOBALG.A.P.) voor telers opgesteld die er toe moeten leiden dat risico's op gewasbesmettingen na gebruik van dierlijke mest en irrigatiewater en na menselijke, dierlijke en machinale handelingen laag zijn. Deze richtlijnen zijn recentelijk aangepast resulterend in versie 6 van GLOBALG.A.P. Teelt bedrijven worden beoordeeld op basis van een bedrijfsspecifieke risico analyse. In het kader van dit rapport zijn de belangrijkste punten:

- 1) Een minimale tijdsinterval van 60 dagen wordt aangehouden tussen bemesting met organische mest (niet hitte-behandeld) en oogst.
- 2) Water dat wordt ingenomen voor irrigatie dient minimaal één keer per jaar microbiologisch te worden geanalyseerd. Als richtlijn wordt een maximale fecale besmettingsgraad van 1000 *E. coli* kve/ 100 ml aangehouden.
- 3) Maatregelen moeten in acht worden genomen om overdracht van humaan pathogene bacteriën via mens, dier en/ of materialen naar het productiegewas te vermijden.

Er wordt gecontroleerd op het nakomen van deze richtlijnen bij gecertificeerde telers dat er toe moet leiden dat besmettingen op geoogste producten beneden wettelijk vastgestelde waarden blijven. Belangrijk hierbij is het creëren van bewustwording bij individuele telers over de microbiologische risico's tijdens gewasproductie en oogst. Op basis van de wetenschappelijke onderbouwing van de GLOBALG.A.P. richtlijnen zouden telers beter instaat moeten zijn om bedrijfsspecifieke risicobeoordelingen te maken.

Deze publiek-private samenwerking richtte zich dan ook op een wetenschappelijke onderbouwing van de meest recente richtlijnen van GLOBALG.A.P., via experimenten in proefvelden en monitoring bij bedrijven. Concrete onderzoeksvragen in dit project waren:

- 1) Wat zijn de prevalenties en dichtheden (indien meetbaar) van humaan pathogene bacteriën in dierlijke mestsoorten die in de praktijk worden gebruikt, en in welke mate nemen dichtheden in bemeste grond en grond bij plantenwortels af gedurende de minimale tijdsinterval van 60 dagen?
- 2) Wat is de mate van besmetting van oogstbare producten na bemesting?
- 3) Hoe verloopt de afname van humaan pathogene bacteriën op bladoppervlakken na (éénmalige) toediening van besmet water?

Beantwoording van deze vragen moet leiden tot betere risico-inschattingen waarbij de kans op besmettingen van oogstbare producten, waaronder groenten en fruit, verlaagd worden wat vervolgens weer moet leiden tot een betere beheersing van de microbiële veiligheid van vers-consumeerbare producten. In dit project wordt de aanname gedaan dat humaan pathogene bacteriën zich kunnen verspreiden via mest, grond, rhizosfeer (dun laagje grond rondom wortels van planten) naar de plant en via water door irrigatie naar het bladoppervlak van de plant. Deze aanname wordt getoetst door monitoring bij diverse teeltbedrijven van groenten en fruit en door experimentele veldstudies met bladgewassen. Aandachtspunt hierbij is de rol die de rhizosfeer mogelijk speelt bij de transmissie van humaan pathogene bacteriën naar planten, omdat via wortellexudatie humaan pathogene bacteriën gestimuleerd kunnen worden in hun groei in de bodem.

2 Uitvoering van veldmonitoring en experimenten in het laboratorium en in proefvelden

Dit is een samenvatting van de uitvoering van bedrijfsmonitoring en experimenten. De volledige beschrijving staat vermeld in de bijlage aan het einde van het verslag.

2.1 Mest, bodem, water en gewasmonitoring bij teeltbedrijven

In totaal zijn er 24 productiepercelen bij 12 verschillende teeltbedrijven bezocht gedurende de onderzoeksperiode van vier jaar (2019 – 2022). In 15 gevallen betrof het percelen onder een biologisch teeltschema. Bij drie bedrijven (bedrijven 1, 3 en 5) zijn er twee tot drie percelen in één jaar gemonitord en ook zijn vijf bedrijven (bedrijven 1, 2, 3, 5 en 7) twee tot drie keer bemonsterd gedurende de periode van het onderzoek (zie Tabel S1 van de bijlage).

Onderzochte gewassen waren: snijbonen, selderij, bloemkool, broccoli, rode biet, ui, spinazie, andijvie, sla, peen, kool en appel. Bij bezoeken aan teeltbedrijven werd in sommige gevallen additionele informatie verkregen die gerelateerd kunnen zijn aan overdracht van humaan pathogene bacteriën naar planten. Deze informatie omvat: bodemtype, historie van landgebruik en gewasrotaties en aanwezigheid van sporen van (wilde) dieren (zie Tabel S1 van de bijlage). Over alle vier de jaren werd (dierlijke) mest, die werd aangebracht op het perceel voorafgaand aan de teelt, bemonsterd uit een silo (13 keer), van mesthopen (zeven keer, waaronder één keer bokashi), uit een kelder (twee keer) en één keer was de herkomst onbekend. In 2020 werden er aanvullend 58 mestmonsters verzameld bij verschillende producenten en samen met de 23 verschillende mestpartijen die gebruikt zijn voor bemesting van de 24 percelen (bij bedrijf 3 is in 2019 dezelfde mest gebruikt voor twee afzonderlijke percelen) onderzocht op aanwezigheid van humaan pathogene bacteriën en hun virulentiegenen. Mest van de 81 monsternames was merendeels afkomstig van vier verschillende diersoorten waaronder varkens, runderen, kippen en geiten. In zes gevallen betrof het mengsels van verschillende mestsoorten of was de herkomst onbekend en één keer betrof het bokashi (gefermenteerd product op basis van niet-dierlijke materialen). Verder werd van 13 percelen voorgaand aan bemesting drie tot zes bodemmonsters per perceel, en van alle 24 percelen vlak voor/ tijdens oogst twee tot vijf bodemmonsters per perceel genomen. Tenslotte werden oogstbare producten van percelen bemonsterd (vijf of 10 monsters per perceel) en in zes gevallen ook stengeldelen (vijf monsters per perceel). Van alle percelen, met uitzondering van appel (bedrijf 11), werd de rhizosfeer van de verschillende

gewassen bemonsterd (vijf monsters per perceel). Ad hoc werd water (indien aanwezig in de nabijheid van percelen; één monster per bedrijf) bemonsterd, wat het geval was bij zes bedrijven (zie Tabel 1 in de bijlage). Eventuele aanwezigheid van humaan pathogene bacteriën in mestmonsters werd bepaald via opkweek na verrijking (levende bacteriën, niet kwantificeerbaar) en via DNA-extractie op verrijkte bacteriemengsels gevolgd door moleculaire detectie op aanwezigheid van relevante genen voor pathogene *E. coli* (*eae* en *ehxA*), STEC (*stx1*, *stx2*), *S. enterica* (*invA*) en *S. Typhimurium* (combinatie van *invA* en STM). Moleculaire detectie op basis van DNA-extracten uit verrijkte bacteriemengsels leverde informatie op over eventuele aanwezigheid van humaan pathogene bacteriën in levende en soms in dode cellen, maar ook in andere levensvormen zoals fagen (relevant voor *stx1* en *stx2* genen). Op basis van verkregen informatie kan een inschatting worden gemaakt of humaan pathogene bacteriën, indien aanwezig in dierlijke mest, via bodem, rhizosfeer naar de plant overgaan. Verder zou visuele monitoring op aanwezigheid van afval, mesthopen, water op het veld en/ of aanwezigheid van dieren/ dierlijke uitwerpselen en ad hoc waterbemonstering inzicht moeten geven op aanwezigheid van additionele risico's op gewasbesmettingen in praktijkpercelen.

2.2 Overleving van humaan pathogene bacteriën in mest onder experimentele omstandigheden en gesimuleerde overdracht via mest naar planten

Veldproeven zijn uitgevoerd op de WUR campus, locatie Nergena, in drie opeenvolgende jaren (2020 – 2022) waarbij de overdracht van humaan pathogene bacteriën via verschillende mestsoorten naar gewassen werd onderzocht. Hierbij werd *E. coli* stam 0611, een niet-pathogene en van nature antibioticum-resistente stam, gebruikt als 'indicatorstam'. De ecologie van deze stam is in eerder onderzoek vergeleken met andere (pathogene) *E. coli* stammen in erwtenplanten en er was geen noemenswaardig verschil in ecologisch gedrag waargenomen [5]. Dichtheden van de *E. coli* indicatorstam en van-nature in mest en bodem aanwezige *E. coli*, 'achtergrond *E. coli*', werden bepaald op verschillende tijdstippen tussen nul en 42 dagen in respectievelijk geënte en ongeënte varkens- en runderdrijfmest, in tweevoud en bewaard onder laboratoriumomstandigheden; dat wil zeggen statisch (niet-schuddend), bij een constante temperatuur van 16°C (meest vergelijkbaar met de omstandigheden zoals die in de praktijk voorkomen). In de veldexperimenten werd de *E. coli* indicatorstam toegevoegd aan verschillende mestpartijen voorafgaand aan de veldstudie, waarna behandelde en onbehandelde (controle op aanwezigheid van achtergrond *E. coli* in

verschillende mestsoorten en partijen) mest en NPK (controle op aanwezigheid van achtergrond *E. coli* in onbemeste grond) werden gemengd met grond (3.5% mest op gewichtsbasis). Bemeste grond werd teruggeplaatst in boorgaten zoals beschreven in Van Overbeek et al. 2021 [6] en beplant met sla (Lollo Rossa) in jaren 2020 en 2021 en met bospeen in 2022. In totaal werden er 11 verschillende partijen mest van verschillende leveranciers toegepast in de veldstudies, waaronder bokashi (2020), champost (2020) varkens- en runderdrijfmest (2020 – 2022), kippenmest (2021, 2022) en biologische rundermest (2021). Tijdsintervallen tussen het mengen van mest met grond en gewasbemonstering was 46 dagen in de veldproef van 2020, 29 en 45 dagen in die van 2021 en 56 dagen in die van 2022; in alle gevallen korter dan de aanbevolen wachttijd van 60 dagen tussen bemesting en oogst zoals aangegeven in de GLOBALG.A.P. richtlijnen. Aanvullend werden er monsters genomen van onbewortelde en bewortelde (rhizosfeer) grond op tijdstippen nul, drie, 15 en 45 dagen na mengen van mest met grond in de veldproef van 2021. Tien planten per behandeling werden bemonsterd (mest, onbewortelde en rhizosfeer grond, buitenste en binnenste bladeren van sla en peen) en dichtheden van de toegevoegde *E. coli* indicatorstam (grond met behandelde mest) en achtergrond *E. coli* (grond met onbehandelde mest) werden bepaald. Verdere details over bemonstering en monsteranalyse staan vermeld in de bijlage, hoofdstuk 2.

2.3 Gesimuleerde overdracht van humaan pathogene bacteriën via irrigatiewater naar planten onder experimentele omstandigheden

Irrigatie-experimenten met water geënt met de *E. coli* indicatorstam werden uitgevoerd in drie opeenvolgende jaren (2020 – 2022) om de overleving van humaan pathogene bacteriën op het bladoppervlak te bepalen. Hiervoor werd bronwater geënt met de *E. coli* indicatorstam tot een dichtheid van 10^6 kve per ml (10^5 keer hoger dan de norm van 1000 kve/ 100 ml gehanteerd in GLOBALG.A.P.). Binnen één uur na enten werden oogstbare andijvieplanten (acht weken oud) éénmalig geïrrigeerd (vergelijkbaar met 17 mm regenval), waarna de buitenste bladeren werden bemonsterd op tijdstippen twee, vier, zes uur en één, twee, drie, zes, 13 en 29-36 dagen. Daarnaast werden rhizosfeermonsters genomen op zes, 13 en 29-36 dagen. Dichtheden van de *E. coli* indicatorstam in de verschillende blad- en rhizosfeermonsters werden bepaald. De afname in de dichtheid van de *E. coli* indicatorstam over tijd werd vastgelegd in twee modellen: 1) volgens een lineaire afname en 2) volgens een exponentiële afname. Verder details staan vermeld in de bijlage, hoofdstuk 3.

3 Resultaten bedrijfsmonitoring, laboratorium en veldexperimenten

3.1 Bedrijfsmonitoring naar overdracht van humaan pathogene bacteriën via mest en water naar planten

In totaal zijn 81 mestmonsters, afkomstig van verschillende bedrijven, bedrijfssystemen en opslagruimtes, verzameld over vier opeenvolgende jaren. Deze monsters zijn via opkweek geanalyseerd op aanwezigheid van humaan pathogene bacteriën (STEC, *S. enterica*/ *S. Typhimurium* en *L. monocytogenes*) en *E. coli*, als indicator organisme, en na DNA extractie op eventuele aanwezigheid van genen die specifiek zijn voor pathogene *E. coli* (*eae*, *ehxA*), STEC (*stx1*, *stx2*), *S. enterica* (*invA*) en *S. Typhimurium* (combinatie van *invA* en STM) (Tabel 1). Van de opgekweekte humaan pathogene bacteriën kwam *L. monocytogenes* het vaakst voor, in 13 mestmonsters, gevolgd door *S. enterica* (in acht mestmonsters) en tenslotte STEC en *S. Typhimurium*, beide in drie mestmonsters. *Escherichia coli* was in 54 mestmonsters aangetroffen, maar deze soort is niet altijd pathogeen (Tabel 1A). Opvallend was de hogere prevalentie van *L. monocytogenes* (acht van 30) in rundermest ten opzichte van varkens- (twee van 35) en kippenmest (één van acht) (Tabel 1B). Tenslotte werden genen die specifiek zijn voor pathogene *E. coli*, STEC, *S. enterica* en *S. Typhimurium* vaak aangetroffen in DNA-extracten van verrijkte cel mengsels verkregen uit varkens- en rundermest. Genen die specifiek zijn voor pathogene *E. coli* (*eae* in 32, en *ehxA* in 47 monsters) en STEC (*stx1* en *stx2* in 51 monsters) werden het frequentst aangetroffen, terwijl de andere genen die specifiek zijn voor *S. enterica* en *S. Typhimurium*, *invA* en STM, minder frequent voor kwamen, in respectievelijk 14 en zes van de 81 mest monsters (Tabel 1A). Opvallend hierbij was dat geen van de genoemde genen voorkomen in DNA-extracten van kippenmest. Verder was opvallend dat de prevalentie voor virulentie genen sterk verschilde tussen varkens- en rundermest. Zo kwamen *eae*, *stx2* en *invA* alleen, of in combinatie met STM, vaker voor in varkensmest en kwam *stx1* vaker voor in rundermest (Tabel 1B).

In 23 mestbatches, die werden gebruikt in de 24 productiepercelen gedurende de onderzoeksperiode, werden humaan pathogene bacteriën aangetroffen (Tabel 2). In twee gevallen betrof het STEC (beide uit rundermest, 2019), in twee gevallen *S. enterica* (in runderdrijfmest, 2019 en in varkensdrijfmest, 2021), in één geval *S. Typhimurium* (varkensmest, 2021) en in vijf gevallen *L. monocytogenes* (drie in rundermest in 2019, één in bokashi in 2019, en één in kippenmest in 2022). Bacteriële isolaten zijn opgeslagen in glycerol oplossing bij -70°C voor eventuele vervolgstudies (Tabel 4 in bijlage). In mest gebruikt op percelen in 2019 werd in vijf gevallen *E. coli* aangetroffen na verrijking en verder

werden in de overige 17 percelen, over de periode tussen 2020 – 2022, in acht gevallen *E. coli* dichtheden gemeten tussen Log 2,6 – 4,5 kve/ g mest. In DNA-extracten van verrijkte mestmonsters werden virulentie genen *eae* (drie), *ehxA* (vier) en *stx2* (drie) aangetroffen. In 13 grondmonsters genomen voorafgaand aan bemesting werd bij één bedrijf (bedrijf 9), in één van de vijf herhalingen *E. coli* aangetroffen met een dichtheid van Log 2,3 kve/ g droge grond. In 24 grondmonsters genomen tijdens de oogst werden in twee gevallen, bij bedrijven 5 (2021) en 9, *E. coli* aangetoond, in beide gevallen in één van de vijf herhalingen met dichtheden van, respectievelijk Log 2,0 en 2,3 kve/ g droge grond. In DNA-extracten van grond van twee van de vijf herhalingen (bedrijf 11) werd het virulentiegen *eae* aangetroffen. In 23 rhizosfeermonsters werd in één geval *L. monocytogenes* aangetroffen (bedrijf 12, waar in 2021 spinazie werd verbouwd) en in twee gevallen *E. coli* (bedrijf 12 en bedrijf 9, waar in 2021 sla werd verbouwd) met dichtheden van respectievelijk Log 1,6 en Log 2,4 kve/g droge grond. In zes watermonsters werd in één geval *E. coli* met een dichtheid van Log 3,4 kve/ 100 ml water aangetroffen (bedrijf 7 in 2021) en in het DNA-extract van het betreffende slootwatermonster werd ook het virulentiegen *eae* aangetroffen. Slootwater werd echter niet gebruikt voor irrigatie en er was geen besmetting van het gewas (spinazie) aangetoond. In 24 gewasmonsters, in zes gevallen aangevuld met stengelmonsters, werd één keer *E. coli* aangetroffen met een dichtheid van Log 2,0 kve/ g plant (spinazie, 2021). In dit specifieke geval (bedrijf 6) was bij spinazieproductie rundermest gebruikt waarin *E. coli* was aangetroffen met een dichtheid van Log 2,8 kve/ g mest en ook werden de virulentiefactoren *ehxA* en *stx2* gedetecteerd in het DNA-extract van het betreffende mestmonster. In grondmonsters genomen voorafgaand, en tijdens de oogst en ook in water aanwezig in de nabijheid van het productieperceel werd geen *E. coli* aangetroffen. Casussen van bedrijven 6 (*E. coli* besmettingen in mest en spinazie planten) en 9 (*E. coli* besmettingen in grond voorafgaand en tijdens de oogst en in de rhizosfeer) duiden op meerdere besmettingen in de overdrachtsketen van mest, bodem, rhizosfeer naar de plant, maar in geen van beide gevallen was de keten compleet. Er kan dus in beide gevallen geen definitieve uitspraak worden gedaan over overdracht van *E. coli* vanuit mest via grond naar het gewas.

Tabel 1. Aanwezigheid van humaan pathogene bacteriën en hun virulentiegenen in dierlijke mest partijen, toegepast in productie van (vers-consumeerbare) gewassen en uitgesplitst per jaar (A) en per diersoort over de jaren heen (B).

| A | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 | Totaal |
|---------------------------------|----------|-----------|-----------|----------|---------------|
| # mestmonsters | 7 | 57 | 13 | 4 | 81 |
| Opgekweekt | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 6 | 38 | 8 | 2 | 54 |
| STEC | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| <i>S. enterica/ Typhimurium</i> | 0 | 7/3 | 1/0 | 0 | 8/3 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 2 | 10 | 0 | 1 | 13 |
| DNA-extractie | | | | | |
| <i>eae</i> | ND | 29 | 1 | 2 | 32 |
| <i>ehxA</i> | ND | 43 | 3 | 1 | 47 |
| <i>stx1</i> | ND | 10 | 0 | 0 | 10 |
| <i>stx2</i> | ND | 38 | 2 | 1 | 38 |
| <i>invA/STM</i> | ND | 14/6 | 0 | 0 | 14/6 |

| B | Kip | Varken | Rund | Geit | Totaal |
|---------------------------------|----------|-----------|-----------|----------|---------------|
| # mestmonsters | 8 | 35 | 30 | 1 | 74 |
| Opgekweekt | | | | | |
| <i>E. coli</i> | 2 | 33 | 16 | 0 | 51 |
| STEC | 0 | 1 | 2 | 0 | 3 |
| <i>S. enterica/ Typhimurium</i> | 0 | 7/3 | 1/0 | 0 | 8/3 |
| <i>L. monocytogenes</i> | 1 | 2 | 8 | 0 | 11 |
| DNA-extractie | | | | | |
| <i>eae</i> | 0 | 21 | 10 | 1 | 32 |
| <i>ehxA</i> | 0 | 27 | 20 | 0 | 47 |
| <i>stx1</i> | 0 | 3 | 7 | 0 | 10 |
| <i>stx2</i> | 0 | 29 | 12 | 0 | 41 |
| <i>invA/STM</i> | 0 | 9/6 | 5/0 | 0 | 6 |

Tabel 2. Gegevens van 12 gewasproductiebedrijven (geanonimiseerd) met resultaten van microbiologische en moleculaire analyses van verzamelde monsters.

| Bedrijf (Bodemsoort) | Jaar | Mestsoort | Gewas | Waarnemingen na microbiologische/ moleculaire analyse |
|---------------------------------|-------------|------------------|---------------|--|
| 1 (zand) | 2019 | RDM | Boon | Mest: Ec (<i>eae</i>), Lm |
| 1 | 2020 | VDM | Boon | |
| 1 | 2020 | RDM | Spinazie | |
| 2 (zand) | 2019 | RDM | Boon | Mest: STEC (<i>stx1</i> , <i>eae</i>), Lm |
| 2 | 2020 | RDM | Boon | |
| 2 | 2021 | RDM | Boon | Mest: Ec (Log 3.7 kve/ g) |
| 3 (klei) | 2019 | Bok | Selderij [B] | Mest: Ec, Lm |
| 3 | 2019 | RDM | Bloemkool [B] | Mest: Ec, Se, Lm |
| 3 | | | Broccoli [B] | |
| 3 | 2021 | KM | Ui [B] | |
| 4 (klei) | 2019 | RDM | Rode biet [B] | Mest: Ec |
| 5 (klei) | 2019 | RDM | Ui [B] | Mest: STEC (<i>stx2</i>) |
| 5 | 2019 | KM | Ui [B] | |
| 5 | 2021 | KM | Peen [B] | Grond oogst: Ec (Log 2.0 kve/g dr. gr.) (1/5) |
| 5 | 2021 | RDM | Kool [B] | Mest: Ec (Log 3.3 kve/ g); DNA, <i>eae</i> |
| 5 | 2022 | RDM | Spinazie [B] | Mest: Ec (Log 4.5 kve/ g); DNA, <i>eae</i> , <i>ehxA</i> , <i>stx2</i> |
| 6 (klei) | 2021 | RDM | Spinazie [B] | Mest: Ec (Log 2.8 kve/g); DNA, <i>ehxA</i> , <i>stx2</i> Spinazie: Ec (Log 2.0 kve/g (1/10) |
| 7 (klei) | 2021 | KM | Spinazie [B] | Water: Ec (Log 3.4 kve/ 100 ml); DNA, <i>eae</i> |
| 7 | 2022 | KM | Spinazie [B] | Mest: Lm; Ec (Log 2.6 kve/ g) |
| 8 (zand) | 2021 | RDM | Andijvie | Mest: Ec (Log 2.7 kve/ g); DNA, <i>ehxA</i> |
| 9 (zand) | 2021 | RDM | Sla | Grond voor: Ec (Log 2.3 kve/g dr. gr.) (2/5) Grond oogst: Ec (Log 2.3 kve/g dr. gr.) (2/5) Rhizosfeer: Ec (Log 2.4 kve/g dr. gr.) (1/10) |
| 10 (klei) | 2021 | RDM | Spinazie [B] | Mest: Ec (Log 3.6 kve/ g) |
| 11 (klei) | 2021 | VDM | Appel | Mest: Se, ST; Ec (Log 3.1 kve/ g); DNA, <i>ehxA</i> , <i>stx2</i> DNA Grond oogst: <i>eae</i> (2/5) |
| 12 (klei) | 2022 | GM | Spinazie [B] | Mest: Ec (Log 3.6 kve/ g); DNA, <i>eae</i> Rhizosfeer: Lm; Ec (Log 1.6 kve/ g dr gr) (1/10) |

[B], biologisch geteeld; Ec, *E. coli*; Se, *S. enterica*; ST, *S. Typhimurium*; Lm, *L. monocytogenes*

3.2 Overdracht van de *E. coli* indicatorstam via mest naar planten onder experimentele omstandigheden

De dichtheid van de *E. coli* indicatorstam in varkens- en runderdrijfmest daalde na 14 (varkensdrijfmest) en 21 (runderdrijfmest) dagen tot een niet-meer-te-detecteren niveau (Figuur 1). De toegediende dichtheid van de indicatorstam was 17 (varkensdrijfmest) tot 547 (runderdrijfmest) keer hoger dan de achtergrond *E. coli* populatie. Opvallend was dat in beide mestsoorten de afname van de achtergrond *E. coli* langzamer was dan van de toegevoegde *E. coli* indicatorstam. Namelijk, de dichtheid van de achtergrond *E. coli* in varkensdrijfmest bereikte na 28 dagen een niet-detecteerbaar niveau. In runderdrijfmest was de grens van detectie van de achtergrond *E. coli* na 21 dagen bereikt, hetzelfde als bij de *E. coli* indicatorstam maar hiervan was de aanvangsdichtheid hoger. Hieruit kan worden opgemaakt dat een opslagperiode van drie tot vier weken leidt tot een significante reductie in de dichtheid van humaan pathogene bacteriën. Verder was opvallend dat er een omgekeerde relatie in uitdoving was tussen de *E. coli* indicatorstam en de achtergrond *E. coli*, wat aangeeft dat beide populaties met elkaar concurreren, mogelijk om dezelfde voedingsbronnen aanwezig in mest.

De toegevoegde *E. coli* indicatorstam nam af in grond bemest met biologische rundermest, varkensdrijfmest, runderdrijfmest en NPK tot een niet detecteerbaar niveau tussen 29 en 43 dagen in 2021 en in grond bemest met varkensdrijfmest, runderdrijfmest en NPK tot een niet detecteerbaar niveau tussen 14 en 28 dagen in 2022 (Figuur 2). Opvallend was dat de *E. coli* indicatorstam in grond met kippenmest alleen aantoonbaar aanwezig was op de eerste dag na mest inmenging in grond en daarna niet meer in 2021, terwijl in 2022, in een andere partij kippenmest, de indicatorstam pas op dag 52 niet meer detecteerbaar was. Verder viel op dat de achtergrond *E. coli* populatie in grond bemest met kippenmest in 2021 niet detecteerbaar was, terwijl deze in 2022 wel detecteerbaar was tot en met dag 77 na mengen van mest in grond. Achtergrond *E. coli* in mest werd ook aangetroffen in grond gemengd andere mestpartijen, zoals met biologische rundermest in 2021, varkensdrijfmest in 2021 en 2022 en in runderdrijfmest in 2021 en 2022, maar dichtheden varieerde per mestsoort en per partij van dezelfde mestsoort gebruikt over de verschillende jaren. Achtergrond *E. coli* in grond werd aangetroffen op de eerste dag na mengen van NPK in grond in 2022.

De *E. coli* indicatorstam werd in 10 van de, in totaal, 100 sla-rhizosfeermonsters uit de experimenten van 2020 en 2021 aangetroffen na grondbehandelingen met champost, bokashi,

rundermest, varkensdrijfmest en kippenmest (Tabel 3). Dichtheden van de *E. coli* indicatorstam varieerde tussen Log 2,1 en 2,7 kve/ g droge grond. Achtergrond *E. coli* werd aangetroffen in 17 van de 100 sla-rhizosfeermonsters over beide jaren na bodembehandelingen met bokashi, varkensdrijfmest, kippenmest en NPK, met dichtheden variërend tussen Log 1,9 en 3,3 kve/ g droge grond. Opvallend was de aanwezigheid, weliswaar in lage dichtheden, van de *E. coli* indicatorstam en achtergrond *E. coli* in de sla-rhizosfeer behandeld met kippenmest in 2021 (Tabel 3) terwijl beide populaties na de eerste dag na mengen niet meer detecteerbaar waren in bemeste grond (Figuur 2).

De *E. coli* indicatorstam werd één keer aangetroffen in twee slaplanten bemest met bokashi in 2020 (gemiddelde dichtheid Log 2,4 kve/ g plant; Tabel 3) en één keer op peen in 2022 met een dichtheid van Log 2,0 kve/ g plant. Achtergrond *E. coli* werd aangetroffen in één slaplant bemest met bokashi, in één slaplant bemest met varkensdrijfmest en in twee slaplanten bemest met NPK in 2020 en in één slaplant bemest met NPK in 2021. De prevalentie (uitgedrukt in het aantal monsters waarin de *E. coli* indicatorstam of de achtergrond *E. coli* werd aangetroffen ten opzichte van het totaal aantal monsters) lag op 1:100 (1%) voor de *E. coli* indicatorstam en op 6% voor de achtergrond *E. coli*. Wanneer prevalenties in de slakrop worden vergeleken met die van de rhizosfeer, dan blijkt dat de prevalenties van beide *E. coli* populaties in de rhizosfeer (10 en 17% voor, respectievelijk, de *E. coli* indicator stam en de achtergrond *E. coli* populatie) hoger te zijn dan in de slakroppen. Wanneer prevalenties tussen *E. coli* populaties worden vergeleken, dan blijkt de prevalentie van de achtergrond *E. coli* hoger te zijn dan van de *E. coli* indicatorstam in de rhizosfeer en in slakroppen.

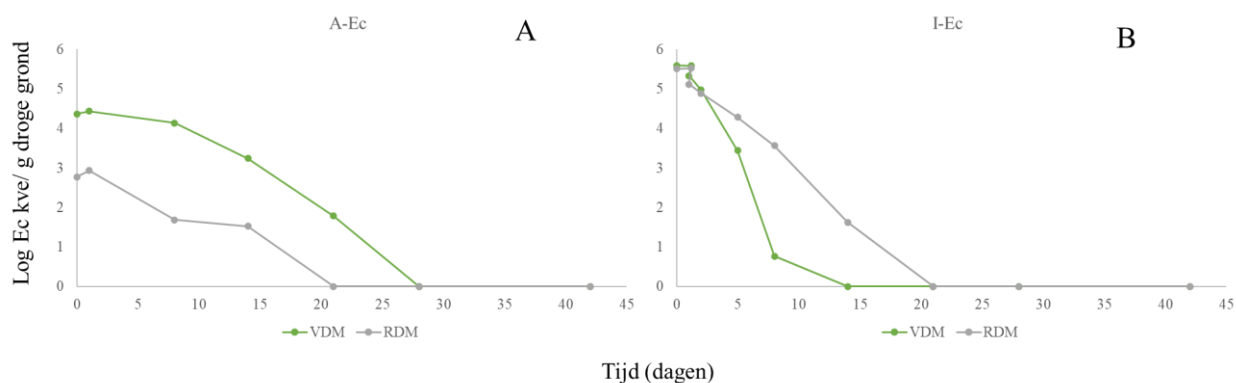
3.3 Overleving van de E. coli indicatorstam op andijvie bladeren en rhizosfeer na éénmalige irrigatie

De *E. coli* indicatorstam aangebracht op oogstbare andijvieplanten via éénmalige irrigatie was op het bladoppervlak detecteerbaar tot 29 en 36 dagen in de experimenten van respectievelijk 2020 en 2021 en tot en met 36 dagen in het experiment van 2022. De afname in dichtheden van de indicatorstam volgde een asymptotisch verloop en een exponentiële functie bleek het best verklarende model te zijn om de afname te beschrijven. Uit regressie analyse bleek dat, door gebruik te maken van een exponentiële functie, tussen 83 en 94% van de monsternamenpunten over alle drie de experimenten, in het exponentiële model te passen met een zeer grote waarschijnlijkheid ($P < 0.001$; Figuur 3A). Het snelste verval in dichtheid

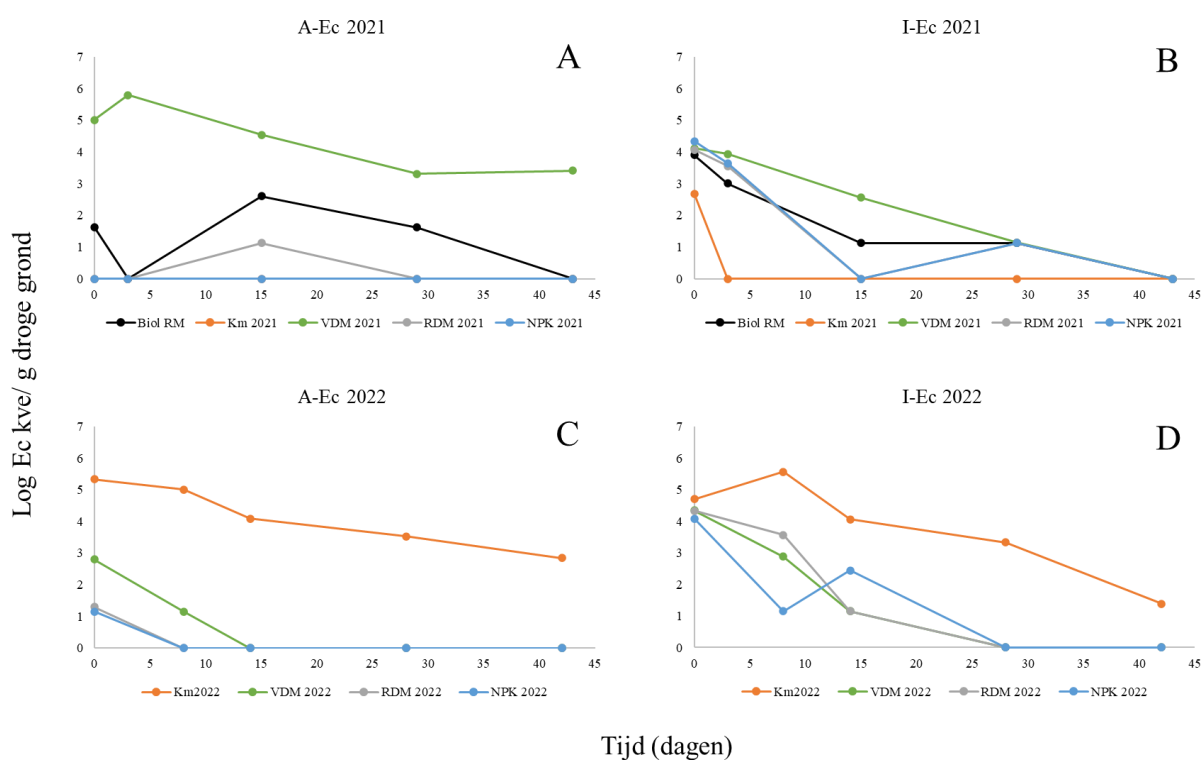
van de indicatorstam vond plaats in de eerste fase tussen twee uur en drie dagen na irrigatie en deze afname was lineair. In de tweede fase boog de curve af, waarna de afname verminderde. De afnamesnelheid gedurende de eerste fase was Log 0,75, Log 0,70 en Log 0,92 kve/ dag in, respectievelijk, de experimenten van 2020, 2021 en 2022.

Er was een relatie tussen de gemeten temperatuur op de dag van irrigatie en de afnamesnelheid van de indicatorstam in de drie daaropvolgende dagen. Lineaire regressie tussen beide parameters vertoonde een negatieve correlatie ($P=0.044$), wat er op neer komt dat naarmate de temperatuur toeneemt, de aangebrachte *E. coli* indicatorstam op het bladoppervlak sneller afneemt. Andere parameters (dauwpunt, lichtintensiteit en luchtvochtigheid op dag 1 en gemiddelde temperatuur, dauwpunt, lichtintensiteit en luchtvochtigheid in de periode tussen twee uur en drie dagen na irrigatie) gaven geen significante correlaties met de afnamesnelheid van de indicatorstam op het bladoppervlak.

De *E. coli* indicatorstam was na éénmalige irrigatie ook aantoonbaar aanwezig in de andijvie-rhizosfeer tot 29 dagen in het experiment van 2020 en tot en met 36 dagen in die van 2021 en 2022 (Figuur 3B). De dichtheid van de *E. coli* indicatorstam in de rhizosfeer nam lineair af in de tijd en berekend op basis van lineaire regressie analyse ($P<0.001$ en verklarend tussen 70 en 96% over de drie experimenten) waren de afnamesnelheden Log 0,14, 0,13 en 0,091 kve/dag voor respectievelijk de experimenten van 2020, 2021 en 2022. De *E. coli* indicatorstam was in de eerste twee monsternames in 2020 (na drie en negen dagen) en 2021 en 2022 (beide na zes en 13 dagen) aanwezig in alle de 10 herhalingen, wat neer komt op een prevalentie van 100%. In de derde (laatste) monstername daalde de prevalentie op dag 29 (in het experiment van 2020) tot 0 van 3 (0%), op dag 36 (in 2021) tot 1 van 10 (10%) en op dag 36 (in 2022) tot 3 van 10 (30%). Opvallend was dus de hoge prevalentie van 100% van de *E. coli* indicator stam in de andijvie-rhizosfeer tot bijna twee weken na éénmalige beregening.



Figuur 1. Overleving van achtergrond *E. coli* (A) en de toegevoegde *E. coli* indicatorstam (B) in twee verschillende mestsoorten.

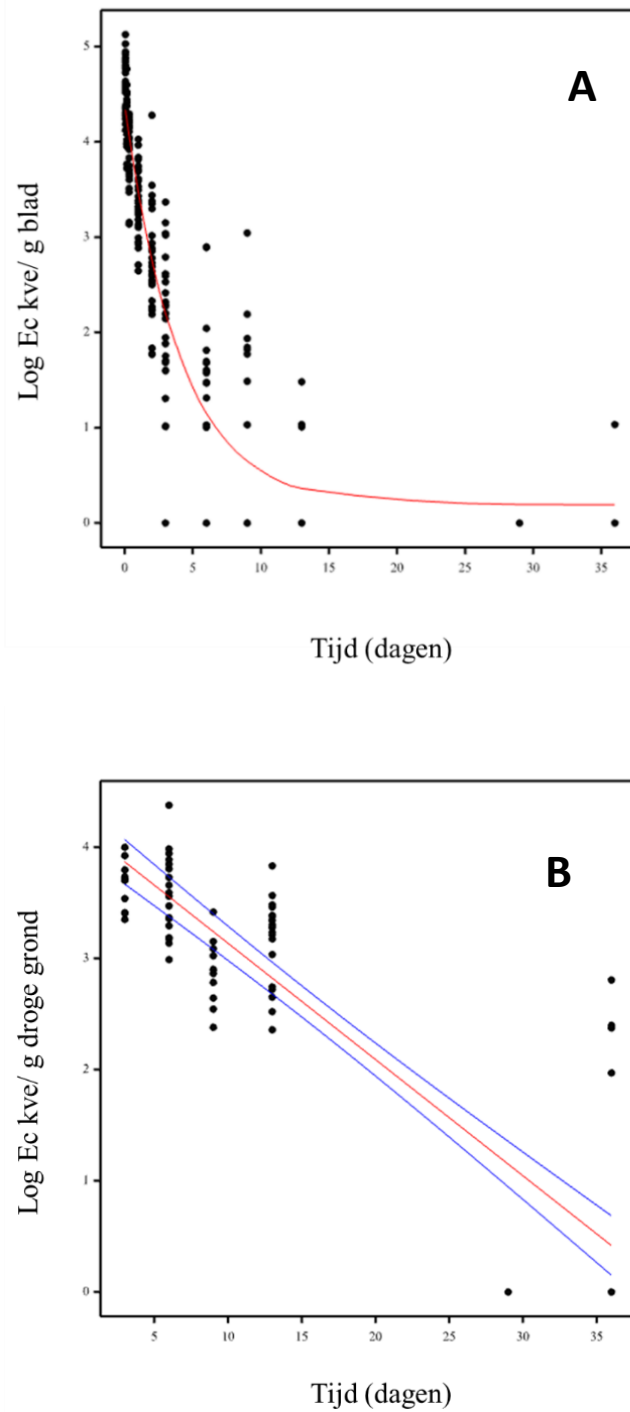


Figuur 2. Overleving van de achtergrond *E. coli* (A, C) en de toegevoegde *E. coli* indicatorstam (B, D) in grond gemengd met verschillende mestsoorten en uitgevoerd op twee verschillende tijdstippen, in 2021 (A, B) en in 2022 (C, D). Afkortingen, zie legenda Tabel 3.

Tabel 3. Dichtheden, uitgedrukt in gemiddelde waarden over 10 planten in Log kve/ droge grond of plant, en prevalenties van de achtergrond *E. coli* en de toegevoegde *E. coli* indicatorstam. Slaplanten (Lollo Rossa) werden geteeld in bemeste grond in experimentele veldstudies uitgevoerd in 2020 en 2021.

| Mestsoort (jaar) [periode tussen bemesting en oogst] | Log kve/ g dr grond of plant (aantal van 10 herhalingen) | | | | | |
|--|--|----------------|----------------|-----------|----------------|----------------|
| | Rhizosfeer | | Binnen krop | | Buiten krop | |
| | A-Ec | I-Ec | A-Ec | I-Ec | A-Ec | I-Ec |
| CHAM (2020) [42 d] | <i>nd</i> | 2,2 (2) | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> |
| BOK (2020) [42 d] | 2,1 (1) | 2,5 (4) | 1,3 (1) | <i>nd</i> | 1,7 (1) | 2,4 (2) |
| RM (2020) [42 d] | <i>nd</i> | 2,1 (1) | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> |
| Biol RM (2021) [45 d] | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> |
| VDM (2020) [42 d] | 2,6 (1) | 2,2 (1) | <i>nd</i> | <i>nd</i> | 2,4 (1) | <i>nd</i> |
| VDM (2021) [45 d] | 2,9 (10) | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> |
| RDM (2021) [45 d] | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> |
| KM (2021) [45 d] | 2,2 (1) | 1,8 (2) | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> |
| NPK (2020) [42 d] | 2,4 (4) | - | 2,1 (2) | - | <i>nd</i> | - |
| NPK (2021) [45 d] | <i>nd</i> | <i>nd</i> | 1,8 (1) | <i>nd</i> | <i>nd</i> | <i>nd</i> |

nd, niet gedetecteerd; -, niet gedaan; Cham, champost; BOK, bokashi; RM, rundermest; Biol RM, biologische rundermest; VDM, varkensdrijfmest; RDM, runderdrijfmest; KM, kippenmest; NPK, minerale mest; A-Ec, achtergrond *E. coli*; I-Ec, indicator *E. coli* stam.



Figuur 3. Afname in de dichtheid van de *E. coli* indicatorstam (Ec) op bladeren (A) en in de rhizosfeer (B) van oogstbare andijvieplanten na aanbrengen via éénmalige irrigatie. Verzamelde gegevens zijn afkomstig van drie onafhankelijke experimenten uitgevoerd in de jaren 2020, 2021 en 2022.

4 Discussie en onderbouwing van de GLOBALG.A.P. richtlijnen op basis van verkregen onderzoeksgegevens

4.1 Evaluatie van risico op overdracht van humaan pathogene bacteriën via mest naar vers-consumeerbare delen van gewassen

Humaan pathogene bacteriën werden aangetroffen in mestpartijen die zijn gebruikt voor bemesting van percelen waarop vers-consumeerbare gewassen zoals groenten en fruit worden geteeld. Via mest, bodem, rhizosfeer vindt transmissie plaats naar de oogstbare delen van de plant. Dit komt er op neer dat humaan pathogene bacteriën die aanwezig zijn in mest in voldoende mate in bemeste grond moeten kunnen overleven, maar ook dat ze in staat moeten zijn om in de nabijheid van plantenwortels uit te groeien door zich te voeden met uitgescheiden organische verbindingen afkomstig van plantenwortels (wortellexudaten), om vervolgens de plant aan de buitenkant of intern te koloniseren. Transmissie van humaan pathogene bacteriën vanuit (dierlijke) mest naar oogstbare delen van planten was in dit project onderzocht door de verschillende onderdelen (mest, bodem, rhizosfeer, gewas) tijdens gewasteelten microbiologisch te monitoren, zowel in de praktijk als onder experimentele omstandigheden in praktijk-gerelateerde veldstudies.

Door in experimentele veldstudies gebruik te maken van *E. coli* populaties die van nature voorkomen in mest (achtergrond *E. coli*) en de, aan mest toegevoegde, *E. coli* indicatorstam kon het risico op gewasbesmettingen worden ingeschat. In deze studie werd aangetoond dat, ondanks het feit dat *E. coli* regelmatig in mest voorkwam, er na bemesting van de productiepercelen, de frequentie van grondbesmettingen (één uit 13 bodemmonster genomen voorafgaand aan de oogst en drie uit 24 grondmonsters genomen tijdens de oogst) en gemeten dichtheden (niet hoger dan Log 2,3 kve/ g droge grond) relatief laag zijn. Experimenten met *E. coli* (zowel de achtergrond populatie als de indicatorstam) in stilstaande mest en in bemeste grond in het veld toonde aan dat er in de tijd verval optrad in gemeten dichtheden. Dit betekent dat *E. coli* dichtheden in de tijd zullen afnemen, zowel in mest als in bemeste grond en dat bewaring van mest gedurende een periode van drie tot vier weken en een vastgestelde intervaltijd tussen bemesting en oogst (60 dagen volgens de richtlijnen van GLOBALG.A.P.) de risico's op overdracht naar planten aanzienlijk zullen verminderen. Of deze waarnemingen extrapoleerbaar zijn naar de andere twee humaan pathogene bacteriën, *S. Typhimurium* en *L. monocytogenes*, is moeilijk te voorspellen. Op basis van taxonomisch verwantschap tussen *E. coli* en *S. Typhimurium* kan worden verwacht dat beide pathogenen

zich vergelijkbaar gedragen in gewasproductiesystemen, maar *L. monocytogenes* is niet verwant aan beide soorten en het ecologische gedrag van deze soort is mogelijk anders dan beide andere soorten [7, 8]. Dit, tegen het licht van het relatief hoge aantal mestmonsters waarin *L. monocytogenes* werd aangetoond maar ook éénmalig aangetoond in spinazie rhizosfeer in 2021, moet worden geconcludeerd dat er een kennishiaat bestaat over het ecologische gedrag van *L. monocytogenes* in plantproductiesystemen.

E. coli werd ook aangetoond in de rhizosfeer van verschillende gewassen tijdens de bedrijfsmonitoring en in de sla-rhizosfeer tijdens de experimentele veldstudies van 2020 en 2021. Het aantal rhizosfeermonsters waarin *E. coli* werd aangetroffen tijdens de bedrijfsmonitoring (twee uit 24 monsters, prevalentie van 8%) kwam overeen met het aantal bulkgrondmonsters waarin *E. coli* of het *E. coli* virulentie gen *eae* werd aangetroffen tijdens de oogst (drie uit 24, prevalentie van 13%). In de rhizosfeer van slaplantenteeld onder experimentele omstandigheden werd de toegevoegde *E. coli* indicatorstam en de achtergrond *E. coli* populatie in respectievelijk 10 en 17 van de 100 monsters aangetroffen. Deze prevalenties zijn weliswaar hoog, maar de waargenomen dichtheden in sla-rhizosfeer waren in dezelfde orde van grootte als de waargenomen dichtheden in grond en rhizosfeermonsters tijdens de bedrijfsmonitoring (tussen Log 2,0 en 3,0 kve/ g droge grond). Op basis van gegevens verkregen uit dit project kan er, ondanks de aanvankelijke verwachting, niet worden opgemaakt dat *E. coli* in dichtheid toeneemt in de sla-rhizosfeer ten opzichte van onbewortelde grond. De prevalentie van achtergrond *E. coli* in de sla-rhizosfeer gemeten tijdens de veldexperimenten (17%) was hoger dan in verschillende rhizosfeer (8%) en bulkgrond (12%) monsters tijdens de bedrijfsmonitoring. Dit, met inachtneming van de kortere wachttijden tussen bemesten en oogst zoals aangehouden in beide veldexperimenten (maximaal 46 dagen), maakt duidelijk dat de aanbevolen wachttijd van 60 dagen in GLOBALG.A.P. voldoende is om overdracht van humaan pathogene bacteriën naar vers-consumeerbare gewassen te minimaliseren. De variatie in prevalentie van achtergrond *E. coli* in de rhizosfeer bleek groot te zijn, zoals in het geval met varkensdrijfmest in 2021 waarbij in alle van de 10 rhizosfeermonsters achtergrond *E. coli* aanwezig was, terwijl dat in alle andere gevallen slechts incidenteel het geval was (tussen één en vier keer). Er was geen duidelijke relatie aanwezig tussen de prevalentie van de achtergrond *E. coli* en de *E. coli* indicatorstam in de rhizosfeer ten opzichte van die in de binnenste en buitenste delen van de slakroppen. Verder is achtergrond *E. coli* ook aangetroffen in de rhizosfeer van slaplantenteeld behandeld met bokashi, een niet dierlijke mestsoort, en met NPK, minerale mest. Dit maakt duidelijk dat

overdracht van *E. coli* naar de rhizosfeer, en mogelijk dus ook naar de plant (achtergrond *E. coli* was ook aangetoond in sla opgekweekt in grond bemest met NPK in 2021), niet altijd hoeft plaats te vinden in grond die vooraf was behandeld met dierlijke mest. Het is onvoldoende duidelijk waar *E. coli* in onbemeste bulkgrond en rhizosfeer vandaan komt en ook dit moet ook worden aangemerkt als een kennishiaat.

De prevalentie van *E. coli* in vers consumeerbare gewassen wisselde sterk tussen observaties gedaan tijdens de bedrijfsmonitoring en tijdens de veldexperimenten met sla en peen planten, maar *E. coli* dichtheden waren nooit hoger dan Log 3,4 kve/ g plant. Slechts één keer trad er besmetting op met *E. coli* in een slakrop na bemesting met varkensdrijfmest (experimentele veldstudie in 2020). In dit geval was de volledige transmissie route van *E. coli* vanuit varkensdrijfmest, via grond, rhizosfeer naar de slaplant te volgen wat voor de humaan pathogene bacteriën in de bedrijfsmonitoring nergens het geval was. Lage besmettingen met humaan pathogene bacteriën kunnen nog steeds een risico vormen voor de voedselveiligheid afhankelijk van het type pathogeen. Risicobeoordelingen voor voedselveiligheid zijn overigens naast het type pathogeen ook gebaseerd op de mate van blootstelling en aanwezigheid van kwetsbare groepen in de consumentenpopulatie.

Er zijn verschillen in prevalenties en dichtheden tussen de *E. coli* indicatorbacterie en achtergrond *E. coli* populatie, zowel in mest, bemeste bulkgrond, rhizosfeer als in planten. In sommige gevallen lijkt het of de *E. coli* indicator bacterie langer overleeft (figuren 2C en D), maar dat komt omdat aanvangsdichtheden van de toegevoegde *E. coli* indicatorstam soms wel 17 – 547 keer hoger was dan die van de achtergrond *E. coli* populatie. Door de lagere aanvangsdichtheden bereikt de achtergrond *E. coli* populatie sneller de detectiegrens. Dat de achtergrond *E. coli* beter overleeft dan de *E. coli* indicatorstam in de verschillende ecosystemen heeft twee redenen: 1) de achtergrond *E. coli* is al ecologisch aangepast aan de omgeving en de *E. coli* indicatorstam (nog) niet, en 2) de achtergrond *E. coli* is genetisch divers en de *E. coli* indicatorstam niet, waardoor er bij achtergrond *E. coli* selectie van genetische varianten kan optreden, wat niet het geval zal zijn bij de *E. coli* indicatorstam. Ecologische kennis verkregen met de achtergrond *E. coli* zullen om deze redenen realistischer zijn voor praktijksituaties dan de informatie verkregen met de *E. coli* indicatorstam.

4.2 *Evaluatie van risico op overdracht van humaan pathogene bacteriën via irrigatiewater naar vers-consumeerbare delen van gewassen*

In de experimentele opzet is gekozen voor een éénmalige irrigatie met een dichtheid van 10^6 kve/ ml (10^8 kve/ 100 ml, dus 100,000 keer hoger dan de maximaal toelaatbare dichtheid volgens richtlijnen van GLOBALG.A.P.) van de *E. coli* indicatorstam en deze dichtheid is dus niet realistisch van wat er in de praktijk wordt waargenomen. De reden van deze keuze is dat alleen met een zeer hoge dichtheid de dynamiek van *E. coli* op het bladoppervlak gemeten kan worden. De uitkomsten van de drie irrigatie-experimenten waren éénduidig, namelijk een bimodale afname van de dichtheid van de *E. coli* indicatorstam op het bladoppervlak van andijvie planten, waarbij de afname in de eerste drie dagen na irrigatie lineair verloopt. Dat laatste is belangrijk omdat op basis van verkregen afnamesnelheden eenvoudig uitgerekend kan worden wat per dag de afname is in Log kve eenheden. Op basis van de gemiddelde afname over de drie experimenten zou de *E. coli* dichtheid per dag afnemen met Log 0.8 kve (een meer dan zesvoudige afname). Een tijdsinterval tussen irrigatie en oogst van drie dagen wordt aanbevolen om na irrigatie dichtheden van eventueel aanwezige humaan pathogene bacteriën op het gewas oppervlak te reduceren. Een andere optie zou zijn om het gewas onderaf te irrigeren door druppel irrigatie waarbij water naast, in plaats van op het gewas terecht komt.

De bimodale afname van de indicator bacterie op het bladoppervlak, zoals eerder waargenomen in de studie van Belias et al. (2020) [3], kan worden verklaard door het feit dat het grootste deel van de bacteriecellen plotseling wordt blootgesteld aan omgevingsfactoren, zoals UV, hoge temperatuur en droogte. Vooral hoge temperatuur op de eerste dag bleek een significante invloed te hebben op de afnamesnelheid van de indicatorstam wat aangeeft dat vooral de heersende omstandigheden op de eerste dag na irrigatie bepalend zijn voor afname van besmettingen. De kleine fractie bacteriecellen die beschermd zijn bepalen het tweede deel van de curve, die gekenmerkt wordt door een langzamere afname in de tijd. Uit eerder onderzoek met dezelfde *E. coli* indicatorstam bleek dat cellen zeer snel (binnen enkele seconden) aan het bladoppervlak kunnen hechten en daarmee ook beter beschermd zijn tegen schadelijke factoren zoals bijvoorbeeld desinfectiemiddelen [9]. Dit is de reden dat ook bij zeer lage besmettingen toch cellen aan het blad gehecht zullen blijven en dichtheden hiervan langzaam zullen afnemen in de tijd. Verder zal een ander klein deel van de bacteriecellen beschermende plaatsen vinden op, en in het blad en dat kunnen huidmondjes en hydathoden (waterporiën) zijn, maar ook ruwe structuren op de bovenkant van het blad (adaxiale zijde)

die bescherming bieden, terwijl de onderkant (abaxiale zijde) volledige bescherming biedt tegen hoge lichtintensiteit. Het type gewas zal daarom een belangrijke rol spelen bij overleving van humaan pathogene bacteriën omdat het type bladoppervlak en de stand van de bladeren per plantensoort zullen verschillen. Dit is een belangrijke kanttekening bij dit onderzoek, omdat de experimenten alleen zijn uitgevoerd met andijvie, een open kropgewas met glad bladoppervlak.

Eénmalige irrigatie op het gewas leidde tot een ophoping van de *E. coli* indicatorstam in de rhizosfeer, waarbij er na 13 dagen nog dichtheden werden bereikt tussen Log 3- 4 kve/ g droge grond met een prevalentie van 100%. Daarna namen dichtheden lineair af tot op, of onder het detectie niveau (Log 2 kve/ g droge grond per individuele plant) na meer dan een maand (36 dagen). Dit betekent dat humaan pathogene bacteriën na toediening via irrigatiewater tot een periode van minimaal twee weken in de rhizosfeer van verschillende gewassen aanwezig kunnen blijven. Kanttekening hierbij is dat de toegepaste dichtheid van de *E. coli* indicatorstam in irrigatiewater extreem hoog was, dus lagere dichtheden en prevalenties van *E. coli* en andere fecale bacteriën wordt verwacht in de praktijk na irrigatie met besmet water. In principe vallen wortels met aanhangende grond niet onder de eetbare delen van bijvoorbeeld bladgewassen, maar via opspattend water (na zware regenval), of tijdens oogst, waarbij er grond op de oogstbare delen terecht komen, kunnen er besmettingen ontstaan. De rol van wortels en omliggende grond in de ophoping van humaan pathogene bacteriën zou daarom meer aandacht verdienen omdat daarmee een risico op besmettingen van oogstbare producten kan plaatsvinden. In hoeverre ophopingen van humaan pathogene bacteriën in de rhizosfeer zullen bijdragen aan besmettingen van bovengrondse (eetbare) delen bleek, zoals eerder aangetoond bij de bemestingsexperimenten, niet eenduidig te zijn. Op basis van alle verkregen gegevens uit bedrijfsmonitoring, veld, en irrigatie-experimenten, uitgevoerd in het kader van dit project, kan er echter wel worden opgemaakt dat er geen grootschalige uitgroei van *E. coli* (en mogelijk ook van humaan pathogene bacteriën) in de rhizosfeer plaatsvindt.

In het rapport opgesteld door KWR [10] op basis van de statistische analyse van de Food Compass watermonitoringsgegevens (1200 metingen) over de periode van 2016 – 2020 werd aangegeven dat er een sterk verband bestaat tussen hevige regenval (> 2 mm) en overschrijding van grenswaarden van 1000 en 127 *E. coli* kve/ 100 ml. Voor risicobeoordelingen op bedrijfsniveau zou er overwogen kunnen worden om

microbiologische bepalingen van inname water voor irrigatie te doen tijdens de zomermaanden omdat er dan vaak sprake is van perioden van hevige regenval.

5 Conclusies en aanbevelingen vanuit dit onderzoek

5.1 Conclusies

- De dichtheid van *E. coli* in mest neemt af in de tijd en *E. coli* is na drie tot vier weken niet meer detecteerbaar in de twee onderzochte mestsoorten, varkens- en runderdrijfmest. Een opslag periode van drie tot vier weken voorafgaand aan bemesting zal het risico op gewasbesmettingen reduceren.
- De dichtheid van *E. coli* neemt ook in de tijd af in bemeste grond en in de rhizosfeer en het aantal waargenomen besmettingen in slapplanten tussen 42 en 45 dagen na bemesting met dierlijke mest was laag. De aanbevolen wachttijd van 60 dagen volgens de GLOBALG.A.P richtlijn is dus afdoende om het risico op gewasbesmettingen te reduceren.
- In de rhizosfeer kwamen humaan pathogene bacteriën relatief vaker voor (grotere prevalentie) dan in bulk grond, maar bereikte dichtheden in beide typen grond waren vergelijkbaar en dat wijst er op dat humaan pathogene bacteriën niet uitgroeien in de rhizosfeer (balans tussen celvermeerdering en afsterving).
- Ook bij toepassing van niet-dierlijke (bokashi) en minerale mest (NPK) werden (lage) besmettingen waargenomen, wat er mogelijk op kan duiden dat humaan pathogene bacteriën ook voor kunnen komen in onbemeste grond en in andere mestsoorten van niet-dierlijke oorsprong.
- In peen zijn geen besmettingen met humaan pathogene bacteriën waargenomen tijdens de bedrijfsmonitoring en een lage besmetting met *E. coli* in de experimentele veldstudie. Dit wijst er op dat de kans op besmettingen met humaan pathogene bacteriën van ondergronds oogstbare producten zoals peen niet veel verschilt van die van bovengronds oogstbare producten zoals groenten en fruit. Dit ondanks het directe contact tussen ondergronds oogstbare producten en bemeste grond.
- Eénmalige irrigatie van een kropgewas (andijvie) met water (hoog) aangeënt met de *E. coli* indicator stam leidde in alle gevallen tot besmettingen van de eetbare delen, waarna er een bimodale afname in dichtheid plaatsvond. In de eerste drie dagen na irrigatie vond de snelste afname plaats en deze afname was lineair en de afname snelheid was evenredig aan de omgevingstemperatuur op het tijdstip van irrigatie.
- Er is een significante evenredige correlatie tussen de overschrijding van grenswaarden van *E. coli* en hevige regenval. Inname van oppervlakte water voor irrigatie tijdens

perioden van hevige regenval (zomermaanden) zijn dus risicovoller met betrekking tot microbiële besmettingen van gewassen.

5.2.1 Aanbevelingen voor verder onderzoek

- Risico inventarisatie van gewasbesmettingen met humaan pathogene bacteriën moet gebaseerd zijn op (zeer) lage dichtheden en prevalenties in mest, bodem, rhizosfeer en water, zoals waargenomen onder realistische omstandigheden tijdens de praktijkmonitoring. Een deel van de wetenschappelijke literatuur is gebaseerd op experimentele modellen met hoge dichtheden en geringe genetische variatie van onderzochte humaan pathogene bacterie stammen, waarbij er vaak ook uitzonderlijke omstandigheden werden toegepast tijdens de experimentele plantenteelt.
- Er is onvoldoende kennis over grond als bron van humaan pathogene bacteriën. *Escherichia coli* wordt regelmatig in grond aangetroffen en de ecologische relevantie van de bodem in de levenscyclus van *E. coli*, en mogelijk ook van andere zoönotische pathogene bacteriën, is niet duidelijk. Kennis hierover is relevant in het kader van ‘One Health’ vraagstukken rondom menselijke en dierlijke gezondheid.
- De rol van de rhizosfeer als mogelijke vestigingsplaats van humaan pathogene bacteriën is niet duidelijk. Meer duidelijkheid zou er moeten komen over de metabole activiteit van humaan pathogene bacteriën (wel levend, maar niet meer cultiveerbaar) in de rhizosfeer en wat daar de consequenties van zijn op gewasbesmettingen.
- Breder kennis over de overdracht van humaan pathogene bacteriën naar planten is noodzakelijk, vooral voor andere bacteriesoorten buiten de taxonomische groep van *E. coli* zoals *S. enterica* en *L. monocytogenes* [4, 9, 10].
- Over de vestiging van *E. coli* en humaan pathogene bacteriën op het bladoppervlak van verschillende plantensoorten is nog weinig bekend. Vestiging en verspreiding over het bladoppervlak kan leiden tot internalisatie of inkapseling in biofilms waardoor humaan pathogene bacteriën niet meer van eetbare delen verwijderd kunnen worden, ook niet na eventuele desinfectiebehandelingen.

5.2.2 Aanbevelingen voor de praktijk

- Opslag van mest gedurende drie tot vier weken voorafgaand aan bemesting zal het risico op besmettingen van vers-consumeerbare gewassen reduceren.
- De interval tijd van 60 dagen tussen bemesting en oogst, zoals aanbevolen in de richtlijnen van GLOBALG.A.P., is afdoende om het risico's op besmettingen vanuit mest te reduceren.
- Voor het opstellen van een bedrijfsspecifieke risico analyse zou een microbiële analyse van het oppervlaktewater dat gebruikt wordt voor irrigatie van vers-consumeerbare gewassen in de zomermaanden plaats moeten vinden; het tijdstip waarop de kans van besmetting van oppervlaktewater met humaan pathogene bacteriën het grootst is.
- Een wachttijd van drie dagen tussen irrigatie en oogst wordt aanbevolen op basis van de waargenomen snelle reductie in *E. coli* op het bladoppervlak van planten. Een vuistregel is dat in deze periode de *E. coli* dichtheid op het blad met een factor 6 (Log 0.8 kve) per dag afneemt. Wanneer de temperatuur op de dag van irrigatie beneden de 20°C is, is de afname langzamer waarbij het raadzaam is om de wachttijd te verlengen tot vier of vijf dagen.

Referenties

1. Van Leuken, VJPG, Hoeksma, P, Nijsten, DRE, Schijven, JF, Schmitt H, de Roda Husman, A.M. 2017. Verkenning van de microbiologische risico's van mest voor de gezondheid: op basis van een systematisch literatuuronderzoek. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport.
2. Franz E, Semenov AV, Termorshuizen AJ, de Vos OJ, Bokhorst JG, van Bruggen AH. Manure-amended soil characteristics affecting the survival of *E. coli* O157:H7 in 36 Dutch soils. 2008. Environ Microbiol. 313-327. doi: 10.1111/j.1462-2920.2007.01453.x. PMID: 18199123.
3. Belias AM, Sbodio A, Truchado P, Weller D, Pinzon J, Skots M, Allende A, Munther D, Suslow T, Wiedmann M, Ivanek R. 2020. Effect of weather on the die-off of *Escherichia coli* and attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium on preharvest leafy greens following irrigation with contaminated water. Appl Environ Microbiol 86:e00899-20. [https:// doi.org/10.1128/AEM.00899-20](https://doi.org/10.1128/AEM.00899-20)
4. Gu G, Strawn LK, Ottesen AR, Ramachandran P, Reed EA, Zheng J, Boyer RR and Rideout SL. 2021. Correlation of *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in Irrigation Water to Environmental Factors, Fecal Indicators, and Bacterial Communities. Front. Microbiol. 11:557289. doi: 10.3389/fmicb.2020.557289
5. Van Overbeek, L, Lombaers-van der Plas, C, van der Zouwen, P. 2020. The Role of Pea (*Pisum sativum*) Seeds in Transmission of Entero-Aggregative *Escherichia coli* to Growing Plants. Microorganisms, 8, 1271. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091271>
6. Van Overbeek L, Duhamel M, Aanstoot S, van der Plas CL, Nijhuis E, Poleij L, Russ L, van der Zouwen P, Andreo-Jimenez B. 2021. Transmission of *Escherichia coli* from Manure to Root Zones of Field-Grown Lettuce and Leek Plants. Microorganisms.; 9:2289. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112289>

7. Raschle, S, Stephan, R, Stevens, MJA, Cernela, N, Zurfluh, K, Muchaamba, F, Nüesch-Inderbinen, M. 2021. Environmental dissemination of pathogenic *Listeria monocytogenes* in flowing surface waters in Switzerland. *Sci Rep.* 9066. doi: 10.1038/s41598-021-88514-y. PMID: 33907261; PMCID: PMC8079687.
8. Lourenco, A, Linke, K, Wagner, M, Stessl, B. 2022. The saprophytic lifestyle of *Listeria monocytogenes* and entry into the food-processing environment. *Front Microbiol.* 789801. doi: 10.3389/fmicb.2022.789801. PMID: 35350628; PMCID: PMC8957868.
9. Banach, JL, van Bokhorst-van de Veen, H, van Overbeek, LS, van der Zouwen, PS, van der Fels-Klerx, Nierop Groot, MN. 2017. The efficacy of chemical sanitizers on the reduction of *Salmonella* Typhimurium and *Escherichia coli* affected by bacterial cell history and water quality. *Food Control* 81, 137–146.
Doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.05.044
10. Smeets, P, Pronk, T, Raterman, B. 2020. Data verrijking *E. coli* meetgegevens beregeningswater tuinbouw. KWR 2020.112 | Oktober 2020

Bijlage

1. Proefopzet bedrijfsmonitoring

1.1 Globale proefopzet. In totaal waren er 24 productiepercelen bij 12 verschillende bedrijven bezocht gedurende de onderzoeksperiode van vier jaar (2019 – 2022). In 15 gevallen betrof het percelen onder een biologisch teeltschema (zie Tabel 1). Bij drie bedrijven (bedrijven 1, 3 en 5) waren er 2-3 percelen in één jaar gemonitord en ook waren er bij vijf bedrijven (bedrijven 1, 2, 3, 5 en 7) 2-3 bemonsteringen uitgevoerd gedurende de periode van het onderzoek. Onderzochte gewassen waren: snijbonen, selderij, bloemkool, broccoli, rode biet, ui, spinazie, andijvie, sla, peen, kool en appel. Bij bezoeken aan teeltbedrijven werd in sommige gevallen additionele informatie verkregen die gerelateerd kunnen zijn aan overdracht van humaan pathogene bacteriën naar gewassen. Deze informatie omvatte: bodemtype, historie van landgebruik en gewasrotaties en aanwezigheid van sporen van (wilde) dieren (Tabel S1). Over alle vier de jaren werd (dierlijke) mest, aangebracht op het perceel voorafgaand aan de teelt, bemonsterd uit een silo (13 keer), van mesthopen (zeven keer, waaronder één keer bokashi), uit een kelder (twee keer) en één keer was de herkomst onbekend. Observaties en aanvullende informatie per perceel staan vermeld in Tabel S1. In 2019, 2020 en 2022 werd de monsternamen van bodem en planten uitgevoerd voor Wageningen Universiteit & Research (WUR) en in 2021 door Wijtzes Food Consultancy (WFC) in Arkel. De toegepaste analyse methoden voor detectie van diverse humaan pathogene bacteriën, gebruikt door WFC, kwamen overeen met die van WUR (paragraaf 4). De door WFC gebruikte en geaccrediteerde protocollen staan vermeld in Tabel S2.

1.2 Mest bemonstering bij/ door producenten. In totaal waren er 23 verschillende mestpartijen onderzocht op aanwezigheid van humaan pathogene bacteriën die zijn aangebracht op de 24 percelen (bedrijf 3 in 2019 was dezelfde mest gebruikt voor twee afzonderlijke percelen). In 2020 werden er aanvullend 58 mestmonsters verzameld bij verschillende producenten. Mest van in totaal 81 partijen was merendeels afkomstig van vier verschillende diersoorten waaronder varkens, runderen, kippen en geiten. In zes gevallen betrof het mengsels van verschillende mestsoorten of was de herkomst onbekend en één keer betrof het bokashi (gefermenteerd product op basis van niet dierlijke materialen). Monsters van de 23 mestpartijen die op de 24 percelen werden aangebracht waren verzameld op de dag van uitrijden. De overige 58 mestmonsters werden op

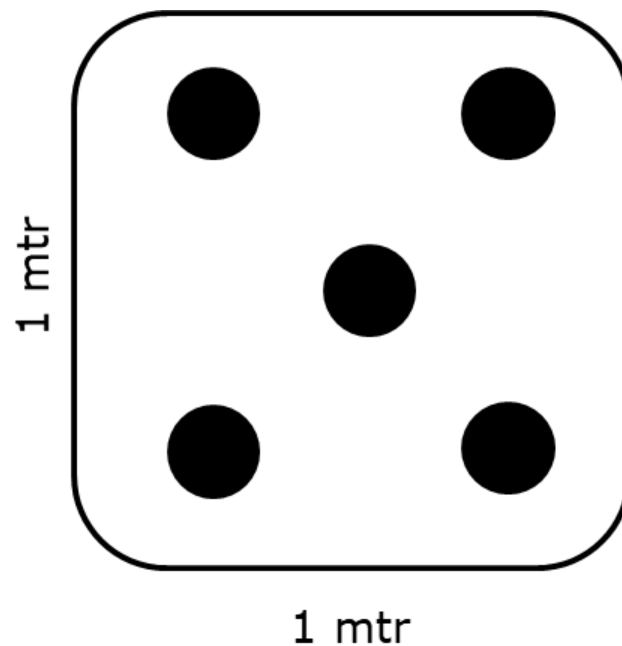
verschillende tijdstippen gedurende het voorjaar en zomer van 2020 verzameld. Per partij werd er één monster samengesteld op basis van minimaal vijf submonsters. Deze submonsters werden op verschillende locaties en/ of op verschillende tijdstippen van aftappen verzameld, afhankelijk van de mestsoort en opslaglocatie; mesthoop (o.a. bokashi), (geroerde) silo, stal, of mestkelder (verzameld via de spuitmond). De mest werd opgevangen in steriele 50 ml buizen, gelabeld en onder gekoelde omstandigheden vervoerd naar het laboratorium voor verdere verwerking. In het geval van bemonstering door een mestrijder werd de mest verzameld in een plastic zak, gelabeld en dicht geseald verstuurd naar het laboratorium voor verdere verwerking.

1.3 Grond bemonstering op productiepercelen. Per perceel werden samengestelde grondmonsters genomen voor analyse op aanwezigheid van humaan pathogene bacteriën en hun virulentiegenen. Van 13 percelen werd voorgaand aan het inwerken van de mest in grond (Gv ‘grond voor’, in Tabel S1) drie tot zes bodemmonsters per perceel genomen en van alle 24 percelen werd vlak voor/ tijdens oogst (Go ‘grond oogst’) twee tot vijf bodemmonsters per perceel genomen. Monsternamepunten waren van te voren vastgesteld, en vastgelegd op basis van GPS coördinaten, waarbij er rekening werd gehouden met een minimale afstand van 1 meter vanaf de randen van het gewas om eventuele randeffecten te vermijden. Bodemmonsters werden samengesteld uit mengsels van vijf submonsters genomen binnen een oppervlakte van 1 bij 1 meter tot een diepte van niet meer dan 10 cm onder het oppervlak (Figuur S1). Grondmonsters werden individueel verpakt in steriele 50 ml buizen en onder gekoelde omstandigheden vervoerd naar het laboratorium voor verdere verwerking.

1.4 Bemonstering van oogstbare producten, stengeldelen en wortels met aanhangende grond. Planten met hun oogstbare producten, stengeldelen (boon, bloemkool en broccoli in 2019) en wortels met aanhangende grond (rhizosfeer) werden vlak voor, of tijdens de oogst bemonsterd en in een enkel geval was de oogst al afgerond, maar was er een ongeogst deel van het perceel beschikbaar gehouden voor bemonstering. Per perceel werden vijf tot tien gewasmonsters genomen, volgens een van te voren vastgesteld schema. Ook hier werd er niet dichters dan één meter van de gewasrand bemonsterd. Ieder individueel gewasmonster was samengesteld uit drie tot vijf planten (afhankelijk van de grootte van de plant) afkomstig van een oppervlakte van twee bij twee meter. In rij-geteelde gewassen werden binnen hetzelfde oppervlak bemonsterd over minimaal twee rijen. Appels werden bemonsterd van individuele bomen. Samengestelde monsters

werden afzonderlijk verpakt in plastic zakken en onder gekoelde omstandigheden vervoerd. In het laboratorium werden oogstbare delen gescheiden van de overige delen van de plant en werd grond vast aanhecht aan wortels (rhizosfeer) afgespoeld (zie paragraaf 4.1).

1.5 Waterbemonstering. Bij zes bedrijven werden er watermonsters genomen uit beschikbare waterbronnen. In drie gevallen betrof het slootwater, in één geval bassin-, en in één geval grondwater. Water werd in eerste instantie opgevangen in schone emmers en daarna overgebracht naar steriele buizen en gekoeld getransporteerd naar het laboratorium voor verdere verwerking.



Figuur S1. Monstername patroon voor een samengestelde grondmonsters.

Tabel S1. Overzicht van gegevens van de bedrijfsmonitoring

| Bedrijf | Grond soort | Jaar | Mesttype (hoeveelheid in ton/ ha) ¹ | Herkomst | Systeem ² | Gewas | Monsternamen ³ | | | | | | Aanwezigheid dieren | Teelt historie |
|---------|----------------|------|--|----------|----------------------|-----------|---------------------------|----|----|----|---|----------------|----------------------------------|--|
| | | | | | | | Gv | Go | O | Rf | S | W ⁴ | | |
| 1 | Zand | 2019 | RDM | Silo | G | Boon | | 2 | 5 | 5 | 5 | | sporen hond/klein wild | |
| 1 | Zand | 2020 | VDM | Silo | G | Boon | | 2 | 5 | 5 | 5 | | sporen hond/klein wild | |
| 1 | Zand | 2020 | RDM | Silo | G | Spinazie | | 2 | 5 | 5 | - | | sporen hond/klein wild | |
| 2 | Zand | 2019 | RDM | Silo | G | Boon | | 2 | 5 | 5 | 5 | | Geen info | |
| 2 | Zand | 2020 | RDM | Silo | G | Boon | | 5 | 5 | 5 | 5 | | | |
| 2 | Zand | 2021 | RDM | Silo | G | Boon | 3 | 5 | 10 | 5 | | Gw | Sporen groot wild | Peen (2018), Snijmais (2019), Aardappel (2020) |
| 3 | Klei | 2019 | Bok | Mesthoop | B | Selderij | | 2 | 5 | 5 | | S | | |
| 3 | Klei | 2019 | | | | Bloemkool | | 2 | 5 | 5 | 5 | | | |
| 3 | Klei | 2019 | RDM | Silo | B | Broccoli | | 2 | 5 | 5 | 5 | | | |
| 3 | Klei | 2021 | KM (3) | Mesthoop | B | Ui | 6 | 5 | 10 | 6 | | | | Rode biet (2018), Sperciebonen (2019), Bloemkool/Broccoli (2020) |
| 4 | Klei | 2019 | KM | Mesthoop | B | Rode Biet | | 2 | 5 | 5 | | | Sporen kleinwild | Conservenerwten (2018), Aardappel (2019), Uien (2020) |
| 5 | Klei | 2019 | RDM | Silo | B | Ui | | 2 | 5 | 5 | | | | |
| 5 | Klei | 2019 | KM | Mesthoop | B | Ui | | 2 | 5 | 5 | | | sporen hond (uitlaatgebied..) | |
| 5 | Klei | 2021 | KM | Mesthoop | B | Peen | 3 | 5 | 10 | 5 | | | | |
| 5 | Klei | 2021 | RDM | Silo | B | Kool | 3 | 5 | 10 | 5 | | | | |
| 5 | Klei | 2022 | RDM | Silo | G | Spinazie | 3 | 5 | 10 | 5 | | | | |
| 6 | Klei | 2021 | RDM (45) | Silo | B | Spinazie | 3 | 5 | 10 | 5 | | S | Konijnen (visueel) op veld | Aardappel (2018), Gras/klaver/luzerne (2019), Zaaiuien (2020) |
| 7 | Klei | 2021 | KM (8) | Mesthoop | B | Spinazie | 3 | 5 | 10 | 5 | | S | | Tarwe/Selderij/Pompoen (2018), Aardappelen (2019), Suikermais (2020) |

| Bedrijf | Grond soort | Jaar | Mesttype (hoeveelheid in ton/ ha) ¹ | Herkomst | Systeem ² | Gewas | Monstername ³ | | | | | | Aanwezigheid dieren | Teelt historie |
|---------|----------------|------|--|----------|----------------------|----------|--------------------------|----|----|----|---|----------------|------------------------|---|
| | | | | | | | Gv | Go | O | Rf | S | W ⁴ | | |
| 7 | Klei | 2022 | KM (8) | Mesthoop | B | Spinazie | 3 | 5 | 10 | 5 | | | | Peen (2018), Tarwe (2019), Aardappel (2020), Aaiuien (2021) |
| 8 | Zand | 2021 | RDM (35) | Silo | G | Andijvie | 5 | 5 | 5 | 5 | | B | | Japane Haver (2017), Prei (2018, 2019, 2020) |
| 9 | Zand | 2021 | RDM | Kelder | G | Sla | 5 | 5 | 10 | 5 | | | | Bouwland (2017), Grasland (2018), Aardappel (2019), Ijsbergsla (2020) |
| 10 | Klei | 2021 | RDM (40) | Silo | B | Spinazie | 3 | 5 | 10 | 5 | | S | | Witlof (2018), Grasklaver/Spitskool/Witlof (2019), Aardappelen (2020) |
| 11 | Klei | 2021 | VDM | Kelder | G/B | Appel | 3 | 5 | 10 | | | | klein wild sporen | Appel (2018-2020) |
| 12 | Klei | 2022 | GM (39) | ND | B | Spinazie | 3 | 5 | 10 | 5 | | | klein wild sporen | Witlof (2018), Aardappel (2019), Peen (2020), Doperwt (2021). |

1 Bok, bokashi; VDM, varkensdrijfmest; RDM, runderdrijfmest; KM, kippenmest, GM, geitenmest

2 B, biologisch; G, gangbaar

3 Gv, grond voor bemesting, Go, grond vlak voor/ tijdens oogst; O, oogstbaar product; Rf, rhizosfeer; S, stengel; W, water

4 Gw, grondwater; S, sloot; B, bassin.

Tabel S2. Geaccrediteerde protocollen voor detectie van *E. coli* en humaan pathogene bacteriën door WFC in diverse monsters.

| Activiteit | Eenheid | Methode |
|-------------------------|----------------|--|
| <i>E. coli</i> | kve/g | Acc. ISO 16649-2:2001 |
| STEC | in 25 g | Acc. ISO/TS 13136:2012 |
| <i>L. monocytogenes</i> | in 25 g | Equal to ISO 11290-1:2017 |
| <i>Salmonella spp.</i> | in 25 g | Eq. to ISO 6579:2017 (AFNOR UNI 03/06-12/07) |

2. Proefopzet veldexperimenten.

De transmissie route van humaan pathogene bacteriën via mest, bodem, rhizosfeer naar groeiende slaplant (Lollo Rossa) werd onderzocht onder praktijk-gerelateerde omstandigheden, gebruikmakend van natuurlijk aanwezige *E. coli* in mest en de *E. coli* stam 0611 [1] als ‘indicator stam’ toegevoegd aan mest. Experimenten werden uitgevoerd over drie opeenvolgende jaren (2020, 2021, en 2022) bij de proeflocatie ‘Nergena’, Wageningen, onderdeel van WUR (GPS coördinaten: 51,995544, 5,656270). Het experimentele veld van 4 bij 6 m was enkel afgedekt met een vogelnet en verder volledig blootgesteld aan weersfactoren. De historie van het veld voorafgaand aan de experimenten betrof teelten van bloembollen (2016), Soedangras als groenbemester (2017), zeekool (2018) en braak (2019).

Het effect van mestsoort en verschillende partijen van dezelfde mestsoort op overdracht van *E. coli* naar slaplant werd onderzocht. In 2020 werd gebruik gemaakt van: champost (producent in Limburg), Bokashi (producent in zuid Holland), varkensdrijfmest (dezelfde mest als gebruikt bij bedrijf 1 in 2020) en Rundermest (Carus, WUR); in 2021, varkens- en runderdrijfmest (beiden van Carus), kippenmest (producent in Utrecht) en biologische rundermest (producent in Utrecht); en in 2022, varkens- en runderdrijfmest en kippenmest (alles van Carus). Daarnaast werd minerale meststof (NPK) als controle behandeling toegepast om eventuele overdracht van *E. coli* uit grond vast te kunnen stellen. Overleving van *E. coli*, natuurlijk aanwezig in mest, en de toegevoegde *E. coli* indicator stam (tot een niveau van 10^6 kve/ g mest) werd bepaald in dezelfde varkens- en runderdrijfmest partijen als toegepast in de veldproef van 2021. Mest partijen, in tweevoud per behandeling, werden statisch (niet schuddend) bewaard bij 16°C en op regelmatige tijdstippen (nul en vier uur en een, twee, acht, 14, 21 en 42 dagen) bemonsterd en geanalyseerd op aanwezigheid van *E. coli* (zie paragraaf 4.2).

Experimenten werden uitgevoerd zoals eerder beschreven in van Overbeek et al. [2]. De helft van iedere mestpartij werd gemengd met de *E. coli* indicatorstam tot een dichtheid van 10^6 kve/ g mest en de andere helft bleef onbehandeld. Voor aanvang van de experimenten, in April van ieder jaar, werd met behulp van een grondboor (diameter zeven, en diepte 10 cm), gaten geponst in het veld dat was afgedekt met folie. Grond uit de boorgaten werd gemengd in de verhouding van 3.5% mest tot grond, op gewicht basis, waarna de bemeste grond werd

teruggeplaatst in de boorgaten. Voor de behandeling met NPK werd de minerale meststof aan onbehandelde grond toegevoegd en bij de behandeling met NPK met de indicator stam werd de *E. coli* stam tot een dichtheid van 10^4 kve/ g droge grond (gelijk aan alle mestbehandelingen) toegevoegd. Grond in de opgevulde boorgaten werden beplant met voorgekiemde sla (Lollo Rossa) planten in 2020 en 2021 en ingezaaid met bospeen in 2022. Iedere behandeling bestond uit twee rijen van in totaal 30 planten. Bodemvochtgehalte werd wekelijks bepaald door het gewichtsverschil (water) te berekenen tussen verse en overnacht gedroogde (bij 100°C) grond. Regenmeters waren aanwezig op zes verschillende plaatsen in het veld en wekelijks werd de totale hoeveelheid neerslag (regen en irrigatiewater) bijgehouden. Irrigatie met bronwater werd uitsluitend toegepast in de eerste week na uitplant of inzaai en na een periode van drie dagen zonder neerslag. Planten werden bemonsterd op tijdstippen van 42 (2020), 45 (2021) en 56 (2022) dagen na aanplant of inzaai.

3. Proefopzet irrigatie-experimenten

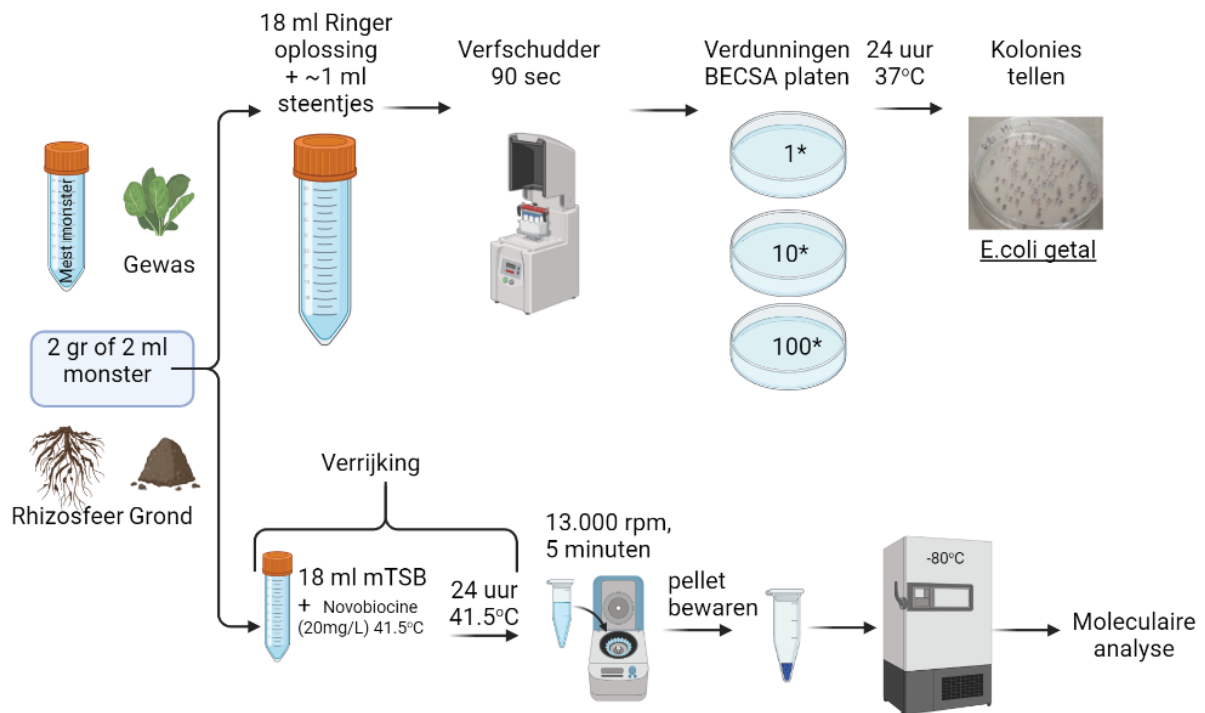
De overleving van humaan pathogene bacteriën via éénmalige irrigatie op het gewas werd onderzocht in drie opeenvolgende jaren (2020, 2021 en 2022), door gebruik te maken van de *E. coli* indicator stam als model. Hiervoor werd de *E. coli* bacteriestam toegevoegd aan bronwater tot een einddichtheid van 10^6 kve/ ml en werd aangeënt water via een gieter eenmalig op zes-weken-oude andijvieplanten gegoten in een hoeveelheid die gelijk stond aan 17 mm regenval. Irrigatie van de andijvieplanten werd uitgevoerd op 2 September 2020, 22 Juni 2021 en op 23 Juni 2022. De buitenste bladeren en de rhizosfeer van 10 planten per bemonstering werden geanalyseerd op aanwezigheid van de *E. coli* indicator stam (zie paragraaf 4.2). Monsternamen van de bladeren vond plaats op tijdstippen twee, vier, zes uur, één, twee, drie, zes, 13 en 29-36 dagen, en van de rhizosfeer op zes, 13 en 29-36 dagen na irrigatie. Tijdens de experimenten werden de luchtvochtigheid en omgevingstemperatuur op gewashoogte (15 cm boven het grondoppervlak) gemeten en de (cumulatieve) lichtintensiteit werd gemeten door een weerstation nabij de Nergena locatie. Bodemvochtgehalte werd wekelijks gemeten volgens de eerder beschreven methode.

4. Microbiële en moleculaire analyse van mest, grond, water en oogstbare producten, stengeldelen en rhizosfeer van planten

4.1 Opwerking mest, bodem, rhizosfeer, water en plant monsters. Gemengde submonsters van mest, grond, plant en wortels met aanhangende grond (twee g) van alle experimenten werden op dezelfde wijze verwerkt voor microbiële en moleculaire analyse (Figuren S2, S3 en S4). Submonsters werden overgebracht naar steriele 50 ml buizen met één g grind en 18 ml Ringer oplossing. Buizen werden 90 s geschud in een verfschudder (Merris Engineering Ltd, Gallway, Ierland) en verkregen suspensies werden verder verwerkt voor microbiële opkweek en DNA extractie. Watermonsters werden direct verwerkt voor microbiële opkweek en voor DNA extractie werd twee ml monster gecentrifugeerd bij 9000 x g gedurende vijf min waarna DNA werd geëxtraheerd van de verkregen microbiële cel pellet. Plant materialen (vijf g oogstbare producten, blad en stengel materiaal) werden overgebracht naar BioReba zakken met 20 ml Ringer oplossing. De zakken met plantmateriaal werden geplet in een 'sample crusher' (twee bar) waarna vloeistof, gescheiden van grof plant materiaal, werd gebruikt voor microbiële opkweek en DNA extracties.

4.2 E. coli bepalingen vanuit opgewerkte monsters. *E. coli* bepalingen in 2019 werden uitgevoerd door middel van verrijking, dus niet kwantitatief, en in de daaropvolgende drie jaren via uitplaten (kwantitatief). In 2019 werd *E. coli* vanuit de diverse monsters verrijkt door twee ml monstersuspensie toe te voegen aan 18 ml mTSB oplossing met novobiocine (20 mg/ l) en gedurende 24 uur schuddend geïncubeerd (100 RPM) bij 41.5°C. Vanuit de verkregen kweeksuspensies werd vijf µl vloeistof uitgestreken over CHROMagar™ O157 agar in een Petrischaal en 16 uur geïncubeerd bij 37°C, waarna platen visueel werden geïnspecteerd op aanwezigheid van typisch mauve-kleurige kolonies, karakteristiek voor *E. coli*. In de jaren 2020 -2022 werd het aantal kolonievormende *E. coli* dichtheden in diverse monsters bepaald, door monstersuspensies direct uit te platen op een semi-selectief agar medium, BECSA. Hiervoor werden monstersuspensies onverdund, of na 10-voudige verdunning, opgebracht op BECSA medium, voor bepaling van natuurlijk aanwezige *E. coli*, of op BECSA met één mg/ L cefotaximine voor bepaling van de *E. coli* indicator stam (0611) (Figuur S2). Gemiddelde kolonie aantallen van ieder monster, vermenigvuldigd met de verdunning en uitgedrukt per g mest of droge grond (bulk en rhizosfeer), per g plant of per

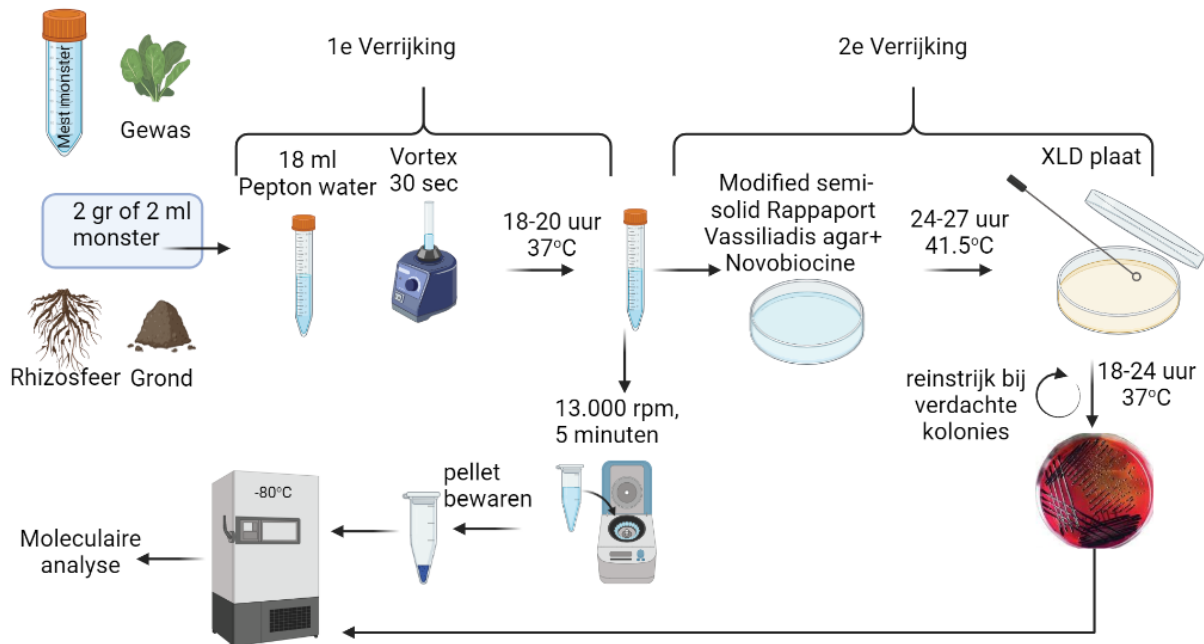
ml water, werden ¹⁰Log getransformeerd. Losliggende paarse kolonies op BECSA werden opgeslagen in 20% glycerol oplossing bij -70°C voor eventueel vervolgonderzoek (Tabel S4).



Figuur S2. Overzicht van monsterverwerking voor bepaling van aanwezigheid en dichtheden van natuurlijk aanwezige *E. coli* en de *E. coli* indicator stam

4.3 *S. enterica* en *S. Typhimurium* bepaling vanuit opgewerkte monsters. Opkweek van *S. enterica* en *S. Typhimurium* werd uitgevoerd door middel van verrijking. Hiervoor werd twee ml monstersuspensie overgebracht naar 18 ml peptonwater en vervolgens 18-20 uur geïncubeerd bij 37°C. Na verrijking werd 200 µl suspensie overgebracht naar Modified semi-solid Rappaport Vassiliadis agar (MSRV) met Novobiocine (20 mg/l), en 24-27 uur geïncubeerd bij 41.5°C. Verkregen kolonies werden uitgestreken op XLD agar platen (Oxoid) en 24 uur geïncubeerd bij 37°C. Losliggende kolonies werden beoordeeld op hun kleur (*Salmonella* soorten kleuren bruin/zwart met een duidelijke heldere zone) (Figuur S3). Bij

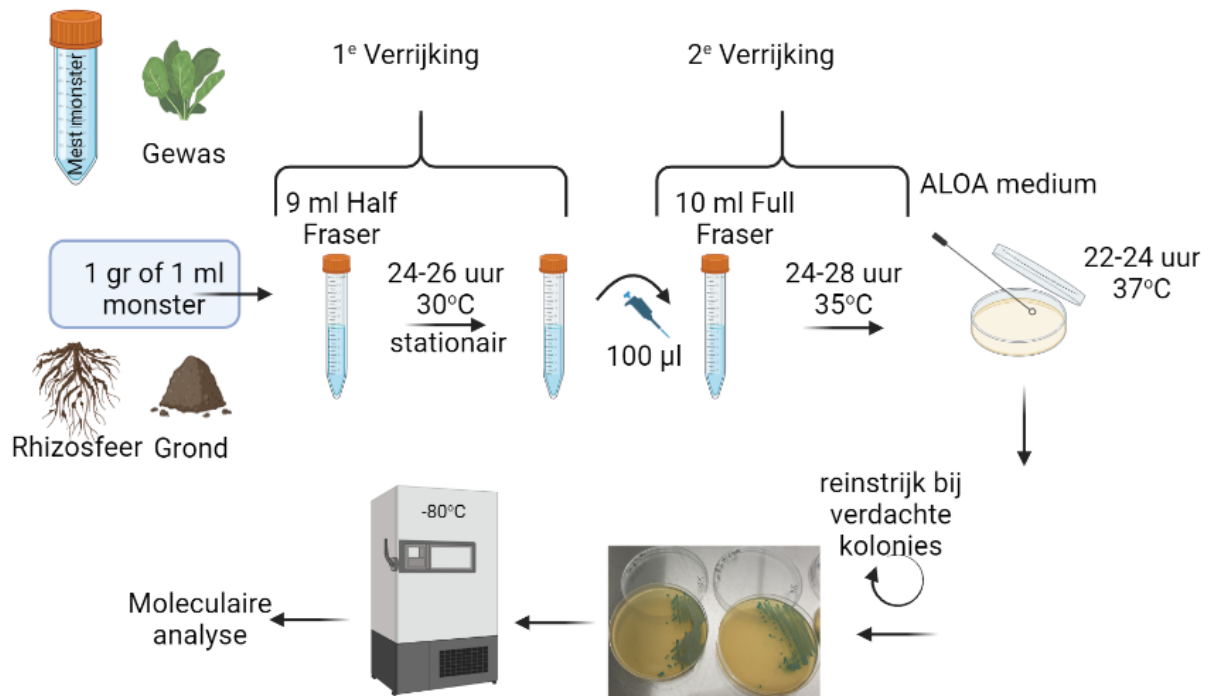
een positieve identificatie werden kolonies opnieuw uitgestreken op verse XLD platen voor verdere moleculaire analyse om *S. enterica* te kunnen onderscheiden van *S. Typhimurium* (paragrafen 4.5 en 4.6). Losliggende zwarte kolonies op XLD en moleculair geïdentificeerd als *S. enterica* of *S. Typhimurium* werden opgeslagen in 20% glycerol oplossing bij -70°C voor eventueel vervolgonderzoek (Tabel S4).



Figuur S3. Overzicht van monsterverwerking voor bepaling van aanwezigheid van *S. enterica* en *S. Typhimurium*.

4.4 *L. monocytogenes* bepaling vanuit opgewerkte monsters. Opkweek van *L. monocytogenes* werd uitgevoerd door middel van verrijking. Hiervoor werd per monster één ml suspensie overgebracht naar negen ml ½ Fraser medium met ½ Fraser supplement (Oxoid) en 26 uur stationair geïncubeerd bij 30°C. Honderd microliter van de aldus verrijkte suspensie werd overgebracht naar 10 ml Fraser met Fraser supplement en 24-28 uur geïncubeerd bij 35°C. Na de tweede verrijking werd vijf µl van de verrijkte cel suspensie uitgestreken op ALOA

agar medium (Ledtechno) en 22-24 uur geïncubeerd bij 37°C. Losliggende kolonies werden beoordeeld op aanwezigheid van de -voor *L. monocytogenes*- karakteristieke magenta kleur met lichtgele halo rondom de kolonie, zoals beschreven in Gaillard et al. [3] (Figuur S4). Monsters waarbij kolonies werden aangetroffen die typerend zijn voor *L. monocytogenes* werden als ‘positief’ aangemerkt op aanwezigheid van *L. monocytogenes*. Losliggende kolonies van *L. monocytogenes* werden opgeslagen in 20% glycerol oplossing bij -70°C voor eventueel vervolgonderzoek (Tabel S4).



Figuur S4. Overzicht van monsterverwerking voor bepaling van aanwezigheid van *L. monocytogenes*.

4.5 DNA extractie van mest, grond, rhizosfeer, water en plant monsters en van bacterie kolonies. DNA uit mest, grond en rhizosfeer suspensies werden direct geëxtraheerd met behulp van de PowerMag® Soil DNA isolation kit. DNA uit water- en plantenmonsters en van reingestreekte bacterie kolonies en celpellets werd geëxtraheerd met behulp van Chelex 100 (50-100 Mesh; BioRad). DNA concentraties van alle extracten werden bepaald met behulp van picogreen in een Infinite 200Pro plaatlezer (Tecan i-control), met gebruikmaking

van een standaard ijklijn. DNA extracten werden bewaard bij -20°C voor verdere PCR analyse.

4.6 PCR detectie van virulentiegenen van humaan pathogene bacteriën in DNA extracten.

Eventuele aanwezigheid van virulentiegenen typerend voor pathogene *E. coli* (*eae*, *ehxA*) en STEC (*stx1*, *stx2*) werd uitgevoerd met behulp van de PCR primers en probes beschreven in Perelle et al. [4] en Nielsen et al. [5] (Tabel S3). De toegepaste PCR conditie voor alle primers was: één cyclus 95°C, 2 min; gevolgd door 40 cycli bij 95°C, 10s en 60°C, 30 s; afgesloten met één cyclus van 72°C gedurende 10 min. In de jaren 2019 en 2020 werden vt1 en vt2 primers volgens Nielsen et al. [5] gebruikt voor detectie van *stx1* en *stx2* genen en in de daaropvolgende jaren de *stx1a* en *stx2*-gerichte primers beschreven in Perelle et al. [4]. Uit validatie-experimenten met DNA extracten van vijf verschillende STEC stammen bleek dat er geen verschil te zijn in verkregen resultaten met vt1 en *stx1a*, en met vt2 en *stx2* primersystemen. Eventuele aanwezigheid van virulentiegenen typerend voor *S. enterica* (*invA*) en voor *S. Typhimurium* (combinatie van *invA* en STM4200 [STM]) werd vastgesteld met behulp van de PCR primers en probes beschreven in Heymans et al. [6] (Tabel S3), onder de eerder beschreven PCR conditie. Eventuele aanwezigheid van virulentiegenen, typerend voor *L. monocytogenes*, werd in twee verschillende PCR stappen vastgesteld op basis van DNA extracten uit losse kolonies op ALOA agar. Uit de eerste stap werd de taxonomisch identiteit op geslachtsniveau (*Listeria* sp.) vastgesteld, met behulp van het *hlyA* primer/ probe systeem (Tabel S3), toegepast onder de eerder beschreven PCR conditie volgens Rodrigues-Lazaro et al., [7]. In de tweede stap werd de taxonomische identiteit op soortniveau (*L. monocytogenes*) vastgesteld, op basis van de PCR primer systemen *prs* en *lmo1030* (Tabel S3), volgens Doumith et al. [8] en Ryu et al. [9]. PCR amplificatie met deze twee primer systemen werd uitgevoerd onder de conditie van: 1 cyclus van 95°C, 2 min; gevolgd door 35 cycli van 94°C, 1 min; 60°C, 30 s en 72°C, 1 min; afgesloten met één cyclus van 72°C, 10 min. PCR amplificaties leverde twee producten op die in 0.8% agarose gel verschilden in molecuul gewicht; één met het *prs* systeem dat een amplicon opleverde met een grootte van 370 bp en die karakteristiek was voor *Listeria* sp. en één met het *lmo1030* systeem dat een amplicon opleverde met een grootte van 509 bp en die karakteristiek was voor *L. monocytogenes* [8. 9].

Tabel S3. Primers en probes voor detectie van virulentie genen van pathogene *E. coli*, STEC, *S. enterica*, *S. Typhimurium* en *L. monocytogenes*.

| | Forward en Reverse primers (Probe) | Amplicon (bp) |
|--|--|---------------|
| <i>E. coli</i>/ STEC | | |
| <i>stx1a</i> , <i>Shiga-toxin 1a</i> | TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG CCCCAGTTCARWGTRAGRTC MACRTC FAM-CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA-IBFQ | 131 |
| <i>Stx2</i> , <i>Shiga-toxin2</i> | TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG CCCCAGTTCARWGTRAGRTC MACRTC FAM-TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC-IBFQ | 128 |
| <i>Eae</i> , <i>intimine</i> <i>gen</i> | CATTGATCAGGATTTTTCTGGTGATA CTCATGCGGAAATAGCCGTTA FAM-ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC-IBFQ | 102 |
| <i>EhxA</i> , <i>hemolysine</i> | CGTTAAGGAACAGGAGGTGTCAGTA ATCATGTTTTCCGCCAATGAG FAM-TCATAAGGAATTCACCGGTTCTGAATTCA-IBFQ | 142 |
| Vt1, verocytotoxin | GGATAATTTGTTTGCAGTTGATGTC CAAATCCTGTCACATATAAATTATTTCTG FAM-CCGTAGATTATTAACCGCCCTTCTCTGGA-IBFQ | 107 |
| Vt2, verocytotoxin | GGGCAGTTATTTTGTCTGTGGA GAAAGTATTTGTTGCCGTATTAACGA FAM-ATGTCTATCAGGCGCGTTTTGACCATCTT-IBFQ | 131 |
| <i>S. enterica</i>/ <i>S. Typhimurium</i> | | |
| <i>InvA</i> , <i>Invasion</i> <i>protein A</i> | GCTGCTTTCTCTACTTAAC GTAATGGAATGACGAACAT FAM- CATCACCATTAGTACCAGAATCAGT-IBFQ | 95 |
| <i>STM4200</i> , <i>putative phage</i> <i>tail fiber</i> <i>protein</i> | CACCTGATATAGAGTCCAA TATAGATGTTGTCGCCAA FAM- AAGGTATTCTTGACTGAACAATGCC-IBFQ | 101 |
| <i>L. monocytogenes</i> | | |
| <i>hlyA</i> , hemolysin listeriolysin | CATGGCACCACCAGCATCT ATCCGCGTGTTTCTTTTCGA FAM-CGCCTGCAAGTCCTAAGACGCCA-IBFQ | 65 |
| <i>prs</i> , phosphoribosyl pyrophosphate synthetase <i>lmo1030</i> | GCTGAAGAGATTGCGAAAGAAG CAAAGAAACCTTGGATTTGCGG GCTTGTATTCACTTGGATTTGTCTGG ACCATCCGCATATCTCAGCCAACT | 370 |
| | | 509 |

Tabel S4. Isolaten van humaan pathogene bacteriën verkregen uit bedrijfsmonitoring en experimenteel onderzoek

| Isolaat nrs | Identiteit | Herkomst en aanvullende informatie |
|--|------------|--|
| Bedrijfsmonitoring & veldexperimenten met mest | | |
| 899-902 | Ec (eae) | Producent 1; RDM (boon); 2019 |
| 941, 942 | Ec/ STEC | Producent 2; RDM (boon); 2019 |
| 883-888 | Ec/ STEC | Producent 5; RDM (ui) 2019 |
| 943 | Ec | Producent 5; grond + KM (ui) 2019 |
| 1040 | Ec | Producent 1; VDM (boon) en veldproef sla; 2020 |
| 1039 | Ec | Champost voort stomen (veldproef sla); 2020 |
| 1038, | Ec | Producent 2; RDM (boon); 2020 |
| 1059 | Ec | Producent 1; Spinazie Rf + RDM; 2020 |
| 1060 | Ec | Producent 1; stengel boon (VDM); 2020 |
| 1051 | Ec | Veldproef, sla blad na champost; 2020 |
| 1052 | Ec | Veldproef,sla blad na VDM; 2020 |
| 1053 | Ec | Veldproef,sla blad na RM; 2020 |
| 1054-1057 | Ec | Veldproef,sla blad na NPK; 2020 |
| 1076, 1079, 1080 | Ec | Veldproef, VDM (sla,); 2021 |
| 1077, 1078, 1081, 1083 | Ec | Veldproef RDM (sla); 2021 |
| 1092 | Ec | Grond met VDM (sla), veldproef 2021 |
| 1094 | Ec | Sla Rf; VDM; veldproef 2021 |
| 1082 | Ec | Veldproef NPK; 2021 |
| 1093, 1095 | Ec | Sla; NPK; veldproef 2021 |
| | | |
| 907-918 | Se | Producent 3; bloemkool Rf; 2019 |
| 1061, 1062 | Se/ST | Producent 11; VDM appel; 2021 |
| 1084, 1085 | Se | Veldproef VDM; 2021 |
| 1097, 1098 | Se | Producent 9; sla, grond met RDM, 2021 |

| | | |
|-----------------------|----|--|
| 944 | Lm | Champost voor stomen (gesequenced!); 2019 |
| 895-898 | Lm | Producent 1; RDM (boon); 2019 (gesequenced) |
| 891-894 | Lm | Producent 3; bokashi, selderij; 2019 (gesequenced) |
| 1096 | Lm | Producent 10; Spinazie Rf, 2021 |
| 1074, 1075 | Lm | Veldproef Biol RM (sla) ; 2021 |
| Mestbemonstering 2020 | | |
| 950, 951 | Ec | 1184166846; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 960, 961 | Ec | 1169288200; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 962, 963 | Ec | 1169288600; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 966, 967 | Ec | 1183912870; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 971 | Ec | 1183912935; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 1009 | Ec | 1183930364; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 1010 | Ec | 1183931875; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 952, 953 | Ec | 1484145555; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 954 | Ec | 1183915950; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 964, 965 | Ec | 1183910329; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 968 | Ec | 1183912897; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 969, 970 | Ec | 1183912919; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 987 | Ec | 1183914024; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 988 | Ec | 1185913656; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 989, 990 | Ec | 1183930186; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 991, 992 | Ec | 1169285287; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1004, 1005 | Ec | 1169319041; VDM, 2020, mestcode 50 |

| | | |
|------------|----|--|
| 1011 | Ec | 1183931891; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1012, 1013 | Ec | 1183931930; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1014, 1015 | Ec | 1183931946; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1016 | Ec | 1183933224; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1019, 1020 | Ec | 1183935315; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1006, 1007 | Ec | 1183930321; vleeskalveren, witvlees; 2020 mestcode 18 |
| 972 | Ec | 1183913605; vleeskalveren, rose; 2020 mestcode 19 |
| 1008 | Ec | 1183930348; vleeskalveren, rose; 2020 mestcode 19 |
| 1017, 1018 | Ec | 1183935269; vleeskalveren, rose; 2020 mestcode 19 |
| 993, 994 | Ec | 1183913362; drijfmest fokzuigen & biggen; 2020 mestcode 46 |
| 995, 996 | Ec | 1183913370; drijfmest fokzuigen & biggen; 2020 mestcode 46 |
| 945, 946 | Se | 1184166749; VDM, 2020, mestcode 5 |
| 973 | Se | 1169288200; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 974, 975 | Se | 1183912935; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 955 | Se | 1183915950; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 958, 959 | Se | 1183918976; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 997, 998 | Se | 1183914016; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 999 | Se | 1185913656; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1000, 1001 | Se | 1183930186; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1026, 1027 | Se | 1183930813; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1028, 1029 | Se | 1183931946; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1024, 1025 | Se | 1183930399; vleeskalveren, witvlees; 2020 mestcode 18 |
| 1030 | Se | 1183935269; vleeskalveren, rose; 2020 mestcode 19 |
| 1002, 1003 | Se | 1183913362; drijfmest fokzuigen & biggen; 2020 mestcode 46 |
| 1022, 1023 | Se | 1175750344; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 947-949 | Lm | 1184166803; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |

| | | |
|------------|----|--|
| 1036, 1037 | Lm | 1183931875; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 976 | Lm | 1159026955; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 977, 978 | Lm | 1169288871; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 979, 980 | Lm | 1183912854; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 981, 982 | Lm | 1183912870; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 984, 985 | Lm | 1183912935; drijfmest behalve vleeskalveren; 2020 mestcode 14 |
| 1032, 1033 | Lm | 1183930305; vleeskalveren, witvlees; 2020 mestcode 18 |
| 1034, 1035 | Lm | 1183930399; vleeskalveren, witvlees; 2020 mestcode 18 |
| 986 | Lm | 1183913605; vleeskalveren, rose; 2020 mestcode 19 |
| 983 | Lm | 1183912919; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 1031 | Lm | 1175750344; VDM, 2020, mestcode 50 |
| 956, 957 | Lm | 1183915950; VDM, 2020, mestcode 50 |

Ec, *E. coli*; Se, *S. enterica*; Lm, *L. monocytogenes*; VDM, varkensdrijfmest;

Referenties

1. Van Overbeek, L, Lombaers-van der Plas, C, van der Zouwen, P. (2020) The Role of Pea (*Pisum sativum*) Seeds in Transmission of Entero-Aggregative *Escherichia coli* to Growing Plants. *Microorganisms*, 8, 1271.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8091271>
2. Van Overbeek L, Duhamel M, Aanstoot S, van der Plas CL, Nijhuis E, Poleij L, Russ L, van der Zouwen P, Andreo-Jimenez B. (2021) Transmission of *Escherichia coli* from Manure to Root Zones of Field-Grown Lettuce and Leek Plants. *Microorganisms*.; 9:2289. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112289>
3. Gaillard N, Dureuil Y, Thepaut J, Simon F. ISO 16140 Validation study of the ALOA® one day method for *Listeria* species detection in foodstuffs and environmental samples. In: Chemunex A, editor. ND.
4. Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. (2004) Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases. *Mol Cell Probes*. 18:185-92. doi: 10.1016/j.mcp.2003.12.004.
5. Nielsen EM, Andersen MT. (2003) Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay. *J Clin Microbiol*. 41:2884-93. doi: 10.1128/JCM.41.7.2884-2893.
6. Heymans R, Vila A, van Heerwaarden CAM, Jansen CCC, Castelijin GAA, van der Voort M, et al. (2018) Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLoS One*.;13(10):e0206316. doi: 10.1371/journal.pone.0206316.
7. Rodriguez-Lazaro D, Hernandez M, Scotti M, Esteve T, Vazquez-Boland JA, Pla M. (2004) Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* targets and AmpliFluor technology. *Appl Environ Microbiol*. 70:1366-77. doi: 10.1128/AEM.70.3.1366-1377.2004.
8. Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P. (2004) Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 42:3819-22. doi: 10.1128/JCM.42.8.3819-3822.2004.

9. Ryu J, Park SH, Yeom YS, Shrivastav A, Lee S-H, Kim Y-R, et al. (2013) Simultaneous detection of *Listeria* species isolated from meat processed foods using multiplex PCR. Food Control. 32:659-64. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.01.048.