



Effect van mestverwerking op verspreiding van pathogenen, resistente bacteriën en antibiotica via mest

P. Hoeksma, K. Veldman en F. de Buissonjé

Rapport 1312



WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Effect van mestverwerking op verspreiding van pathogenen, resistente bacteriën en antibiotica via mest

P. Hoeksma ¹
K. Veldman ²
F. de Buissonjé ¹

1 Wageningen Livestock Research

2 Wageningen Bioveterinary Research

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Livestock Research (WLR) en Wageningen Bioveterinary Research (WBVR) en werd gesubsidieerd door het Ministerie van Landbouw Natuur en Voedselkwaliteit.

Wageningen Livestock Research
Wageningen, mei 2021

Rapport 1312

Samenvatting NL Dit rapport presenteert de resultaten van metingen die zijn uitgevoerd bij verschillende typen mestverwerkingsinstallaties, te weten biologische behandeling, compostering, drogen, indampen, biomembraanfiltratie, omgekeerde osmose en vergisting. Het doel was de effecten in kaart te brengen van deze manieren van mestverwerking op het voorkomen van pathogenen, resistente bacteriën en antibiotica residuen in de processtromen (tussen- en eindproducten) en aan te geven welke mestverwerkingsmethoden een bijdrage kunnen leveren aan beperking van de introductie en verspreiding van pathogenen, resistente bacteriën en antibiotica residuen in het milieu. Van de onderzochte methoden lijken membraanbioreactoren in combinatie met ultrafiltratie en omgekeerde osmose het meeste perspectief te bieden. Omgekeerde osmose is tevens een effectieve techniek voor verwijdering van antibiotica uit vloeibare mest en het verkrijgen van een antibioticavrij effluent dat op oppervlaktewater geloosd kan worden.

Summary UK This report presents the results of measurements carried out at different types of manure processing plants, namely biological treatment, composting, drying, evaporation, membrane bioreactors, reverse osmosis and anaerobic digestion. The aim was to map the effects of these methods of manure processing on the prevention of pathogens, resistant bacteria and antibiotic residues in the process flows (intermediate and final products) and to indicate which manure processing techniques can contribute to limiting the introduction and spread of pathogens, resistant bacteria and antibiotic residues in the environment. Of the methods studied, membrane bioreactors in combination with ultrafiltration and reverse osmosis seem to offer the most perspective. Reverse osmosis is also an effective technique for removing antibiotics from liquid manure and obtaining an antibiotic-free effluent that can be discharged onto surface water.

Dit rapport is gratis te downloaden van <http://dx.doi.org/10.18174/545864> of op www.wur.nl/livestock-research (onder Wageningen Livestock Research publicaties).



Dit werk valt onder een Creative Commons Naamsvermelding-Niet Commercieel 4.0 Internationaal-licentie.

© Wageningen Livestock Research, onderdeel van Stichting Wageningen Research, 2021

De gebruiker mag het werk kopiëren, verspreiden en doorgeven en afgeleide werken maken. Materiaal van derden waarvan in het werk gebruik is gemaakt en waarop intellectuele eigendomsrechten berusten, mogen niet zonder voorafgaande toestemming van derden gebruikt worden. De gebruiker dient bij het werk de door de maker of de licentiegever aangegeven naam te vermelden, maar niet zodanig dat de indruk gewekt wordt dat zij daarmee instemmen met het werk van de gebruiker of het gebruik van het werk. De gebruiker mag het werk niet voor commerciële doeleinden gebruiken.

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

Wageningen Livestock Research is NEN-EN-ISO 9001:2015 gecertificeerd.

Op al onze onderzoeksopdrachten zijn de Algemene Voorwaarden van de Animal Sciences Group van toepassing. Deze zijn gedeponeerd bij de Arrondissementsrechtbank Zwolle.

Inhoud

Samenvatting	5	
1	Achtergrond	7
2	Materiaal en methoden	9
2.1	Onderzochte mestverwerkingsinstallaties (MVI's)	9
2.1.2	Compostering	10
2.1.3	Drogen	11
2.1.4	Indampen	12
2.1.5	Biologische behandeling en OO	12
2.1.6	Membraanbioreactor met ultrafiltratie	13
2.1.7	Omgekeerde osmose	13
2.1.8	Vergisting	14
2.2	Metingen	14
3	Resultaten en discussie	16
3.1	Micro-organismen	16
3.2	Antibiotica	20
Literatuur		24
Bijlage 1		25
Bijlage 2		26

Samenvatting

Het doel van dit project was de effecten in kaart te brengen van verschillende manieren van mestverwerking op het totaal aantal bacteriën in de mest en op het voorkomen van pathogene bacteriën, resistente bacteriën en antibiotica residuen in de processtromen (tussen- en eindproducten). Hiermee werd beoogd aan te kunnen geven welke mestverwerkingstechnieken een bijdrage kunnen leveren aan het beperken van de verspreiding van pathogenen, resistente bacteriën en antibiotica residuen in het milieu.

De metingen werden uitgevoerd aan de volgende typen mestverwerkingsinstallaties, mestsoorten en processtromen:

Techniek	Mestsoort	Processtromen				
Biologische voorzuivering	Kalvergier	Ruwe mest	Slib	Effluent		
Compostering	Rundveemest	Dikke fractie	Gecomposteerde mest			
	Varkensmest	Dikke fractie	Gecomposteerde mest			
Drogen	Varkensmest	Dikke fractie	Gedroogde mest			
	Pluimveemest	Voorgedroogde mest	Gedroogde mest			
Indampen	Varkensmest	Invoer indamper	Spuiwater			
Biologische behandeling + OO*	Varkensmest	Ruwe mest	Invoer biologie	Concentraat OO	Permeaat OO	
Membraanbioreactor + UF**	Varkensmest	Ruwe mest	Dikke fractie	Invoer MBR***	Afvoer UF	
Omgekeerde osmose	Varkensmest	Ruwe mest	Dikke fractie	Invoer OO	Concentraat OO	Permeaat OO
Vergisting	Varkensmest	Ruwe mest	Vergiste mest			
	Rundveemest	Ruwe mest	Vergiste mest			

* OO = omgekeerde osmose

** UF = ultrafiltratie

*** MBR = membraanbioreactor

De metingen omvatten de in mest voorkomende bacteriën *E. coli*, antibioticaresistente ESBL- *E. coli*, Salmonella, Campylobacter en het totaal kiemgetal. Daarnaast werden 11 antibiotica, behorend tot de groepen tetracyclines, sulfonamiden, chinolonen, macroliden, lincosamides, fenicolen en trimethoprim en die normaal in dierlijke mest kunnen worden aangetroffen, gemeten.

De meetresultaten laten zien dat de concentraties van bacteriën (het totaal kiemgetal) verschillen per mestsoort. De hoogste concentraties zijn gemeten in pluimveemest en kalvergier en lagere concentraties in varkens- en rundveemest. De hoogste gehalten aan antibiotica zijn gemeten in kalvergier en varkensmest. Dit was te verwachten gezien de mate van gebruik van middelen in de verschillende diersectoren en de persistentie van de stoffen.

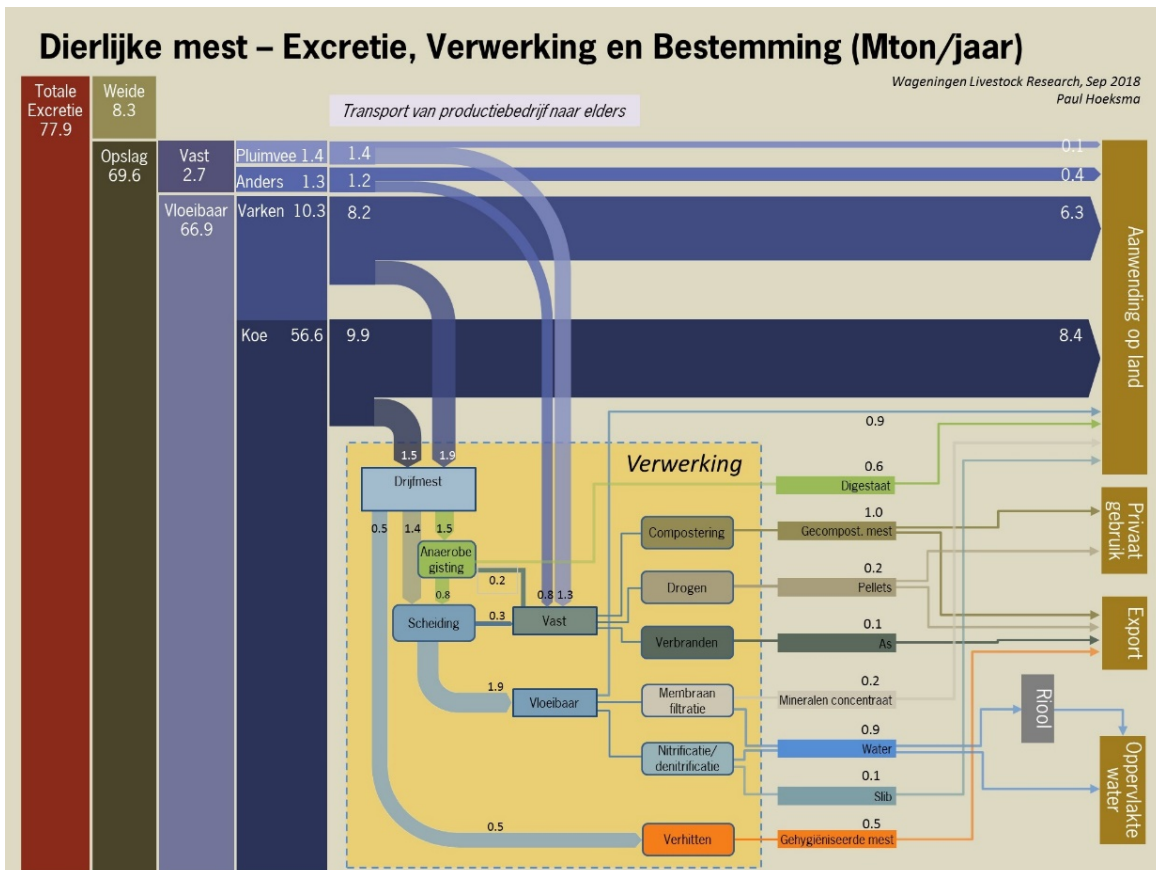
De kwantitatieve bepalingen van de micro-organismen hebben geresulteerd in een aantal meetwaarden onder de aantoonbaarheidsgrens als gevolg van de relatieve ongevoeligheid van de in dit onderzoek toegepaste analysemethode. Een duidelijk beeld van het effect van mestverwerking op *E. coli* en ESBL-*E. coli* kon daardoor niet worden gekregen. Echter, op basis van het totaal kiemgetal en de aan- of afwezigheid van pathogene bacteriën kan het effect van de behandelmethoden onderling worden vergeleken.

Het aantal waarnemingen in dit onderzoek was te beperkt om harde conclusies te kunnen trekken. Toch hebben de metingen waardevolle indicaties opgeleverd over welke mestverwerkingstechnieken een bijdrage kunnen leveren aan het beperken van introductie en verspreiding van pathogenen en resistente bacteriën in het milieu via dierlijke mest. De resultaten wijzen erop dat membraanbioreactoren in combinatie met ultrafiltratie en omgekeerde osmose een sterk reducerend effect op micro-organismen hebben, d.w.z. in de effluenten van deze technieken worden geen micro-organismen meer aangetroffen. Uit eerdere studies is evenwel gebleken dat in de tussenproducten, zoals dikke fractie, effluent MBR en OO-concentraat, wel micro-organismen aanwezig kunnen zijn. Verhitting, tot temperatuur waarbij pasteurisatie plaatsvindt, van deze producten voordat ze als meststoffen worden toegepast kan verspreiding van pathogenen en resistentie in het milieu voorkomen.

Scheiding, mechanisch of d.m.v. bezinking, is een effectieve methode om antibiotica uit vloeibare mest te verwijderen. Omdat veel antibiotica aan vaste deeltjes adsorberen komen ze na scheiding van de mest grotendeels in de dikke fractie of het slib terecht. Dunne fracties en effluenten tonen aanzienlijk lagere gehalten aan antibiotica dan slib en dikke fracties. Het beperkte aantal meetgegevens lijkt erop te wijzen dat tijdens compostering van dikke fracties van rundvee- en varkensmest afbraak van antibiotica kan plaatsvinden, evenals tijdens verwerkingsprocessen met biologische behandeling en omgekeerde osmose. Omgekeerde osmose zorgt voor volledige verwijdering van stoffen uit de dunne fractie van varkensmest en resulteert in een antibioticavrij effluent.

1 Achtergrond

In Nederland worden grote hoeveelheden mest, al dan niet verwerkt, op het land uitgereden. Sinds 2014 zijn veeteeltbedrijven met een mestoverschot verplicht om een deel van het mestoverschot te verwerken. De verplichte mestverwerking heeft geresulteerd in een toename van de mestverwerkingscapaciteit en initiatieven voor nieuwe mestverwerkingsinstallaties. Drijfmest van koeien, varkens en kalveren en vaste mest van pluimvee bevat bacteriën die mogelijk resistent zijn tegen antibiotica en ook antibioticum residuen (Schmitt et al., 2019). Het gevolg daarvan op de ecologie van bodem en oppervlakte water is onbekend. Wel is bekend dat bodem en water reservoirs zijn voor resistente bacteriën, zoals Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) producerende bacteriën. In dit project wordt onderzocht in hoeverre de verschillende manieren van mestverwerking bacteriën en residuen van antibiotica in de mest kunnen verminderen. In strikte zin wordt er onderscheid gemaakt tussen mest 'bewerken' en 'verwerken': mest kan op vele manieren bewerkt worden (zoals scheiden, vergisten, indampen, etc.) maar alleen wanneer mest of mestproducten worden geëxporteerd naar een andere EU-lidstaat is er sprake van 'mestverwerking'. In 2018 is door WLR is in kaart gebracht hoeveel mest in Nederland door verschillende diersoorten werd geproduceerd en op welke wijze dit werd verwerkt. De totale hoeveelheid geproduceerde mest bedroeg in dat jaar bijna 78 miljoen ton (in 2019 was dit 74,6 Mton). Varkens- en rundveemest worden grotendeels onbewerkt op het land gebracht als meststof. Drijfmest van kalveren, varkens en rundvee wordt deels bewerkt, waarbij de vloeibare en vaste fase worden gescheiden. Het volgende schema geeft een overzicht van de hoeveelheden dierlijke mest die in Nederland in 2018 werden geproduceerd en bewerkt. Het aandeel bewerkte mest in 2018 bedroeg ca. 5,5 Mton ofwel ca. 7 % van de totale mestproductie.



Mest bevat fecaal uitgescheiden pathogenen (zoals Salmonella) en resistente bacteriën (waaronder ESBL's) en restanten van toegediende antibiotica. Met uitzondering van thermofiele vergisting en verbranding is niet duidelijk in hoeverre mestverwerking leidt tot reductie van pathogenen, antibioticaresistentie en antibiotica residuen in de eindproducten. In 2020 is in het kader van een Global One Health project door WUR een meststromenmodel ontwikkeld waarin beschikbare informatie over het voorkomen en het lot van antibiotica in de mestketen is opgenomen en waarmee concentraties in onbewerkte mest en eindproducten van mestverwerking berekend kunnen worden (Hoeksma et al., 2020).

Probleemstelling

Gezien de grootte van het reservoir 'mest' als potentiële bron van introductie en verspreiding in het milieu van pathogenen, resistente bacteriën en antibiotica residuen is het voor het beleid van belang om de effecten van de verschillende manieren van mestverwerking op het voorkomen van deze pathogenen, resistente bacteriën en antibiotica residuen in kaart te brengen.

Doelstelling

De doelstelling van het project is een kwantitatieve analyse te geven van de effecten van de verschillende manieren van mestverwerking op het voorkomen van pathogenen, resistente bacteriën en antibiotica residuen in de tussen- en eindproducten.

2 Materiaal en methoden

2.1 Onderzochte mestverwerkingsinstallaties (MVI's)

Tabel 1 geeft een overzicht van de betrokken verwerkingstechnieken, de diersectoren en de te bemonsteren processtromen. Bij de bemonstering werd per processtroom een monster van ca. 1 l genomen via een daarvoor bestemde aftapkraan met uitzondering van ruwe mest, dikke fractie en vergiste mest. Dit materiaal werd bemonsterd vanuit een opslagsilo of -tank; het vaste materiaal (dikke fractie) uit een verse hoop. De monsters werden genomen in de periode oktober 2019 – maart 2020.

Tabel 1 Onderzochte mestverwerkingstechnieken, de betreffende mestsoorten en de bemonsterde processtromen.

Techniek	Mestsoort	Processtromen				
Biologische voorzuivering	Kalvergier	Ruwe mest	Slib	Effluent		
Compostering	Rundveemest	Dikke fractie	Gecomposteerde mest			
	Varkensmest	Dikke fractie	Gecomposteerde mest			
Drogen	Varkensmest	Dikke fractie	Gedroogde mest			
	Pluimveemest	Voorgedroogde mest	Gedroogde mest			
Indampen	Varkensmest	Invoer indamper	Spuiwater			
Biologische behandeling + OO*	Varkensmest	Ruwe mest	Invoer biologie	Concentraat OO	Permeaat OO	
Membraanbioreactor + UF**	Varkensmest	Ruwe mest	Dikke fractie	Invoer MBR***	Afvoer UF	
Omgekeerde osmose	Varkensmest	Ruwe mest	Dikke fractie	Invoer OO	Concentraat OO	Permeaat OO
Vergisting	Varkensmest	Ruwe mest	Vergiste mest			
	Rundveemest	Ruwe mest	Vergiste mest			

* OO = omgekeerde osmose

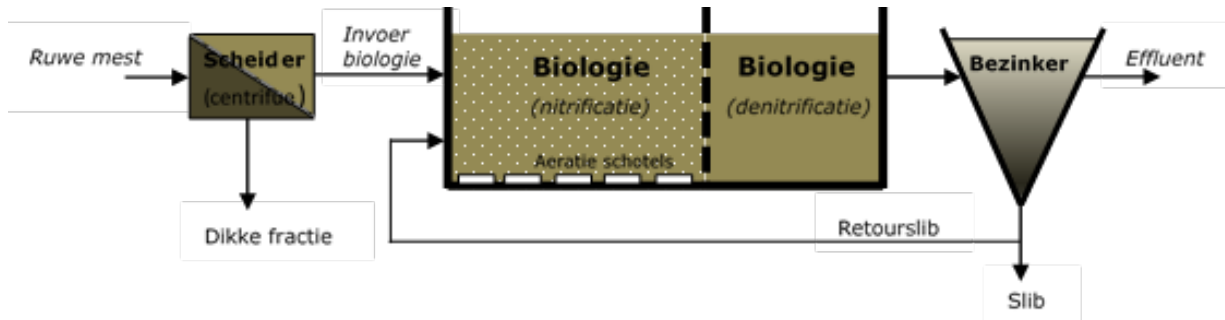
** UF = ultrafiltratie

*** MBR = membraanbioreactor

2.1.1 Biologische voorzuivering

De beschrijving van biologische voorzuivering is afgeleid van Hoeksma et al. (2021). In de kalvergierbehandelingsinstallatie (KGBI) werd de dunne fractie, na mechanische scheiding, biologisch behandeld met de processen nitrificatie en denitrificatie. Door middel van een decanteercentrifuge werden de grove vaste delen afgescheiden. De dunne fractie werd in een bioreactor belucht waarbij in aerob milieu organische stof microbiologisch wordt afgebroken en ammoniakale stikstof omgezet in nitraat. Vervolgens vond in een tweede reactor (zonder beluchting) onder anaerobe omstandigheden denitrificatie plaats waarbij nitraat wordt omgezet in stikstofgas. Op deze wijze werd een groot deel van het organisch materiaal en de ammoniakale stikstof uit de

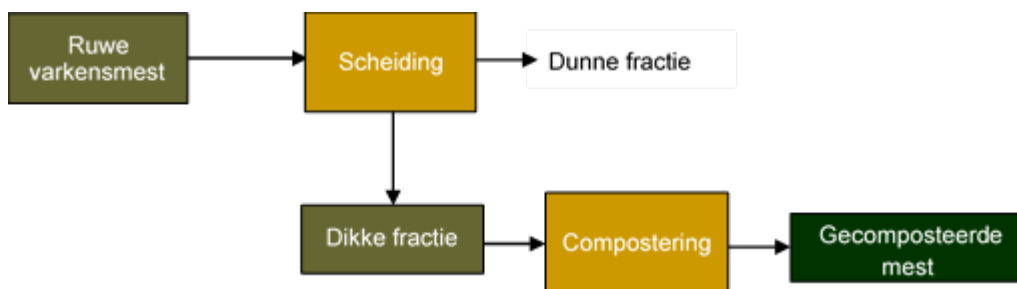
kalvergiel verwijderd. Na biologische behandeling werd de dunne fractie overgepompt naar een bezinktank waar slibafscheiding plaatsvond. Het effluent werd op het vuilwaterriool geloosd en afgevoerd naar een RWZI voor verdere zuivering. In de beschouwde behandelingsinstallatie is dus sprake van voorzuivering. De belangrijkste procesonderdelen van deze installatie zijn schematisch weergegeven in Figuur 2.1.



Figuur 2.1 Schematische weergave van het proces van biologische voorzuivering.

2.1.2 Compostering

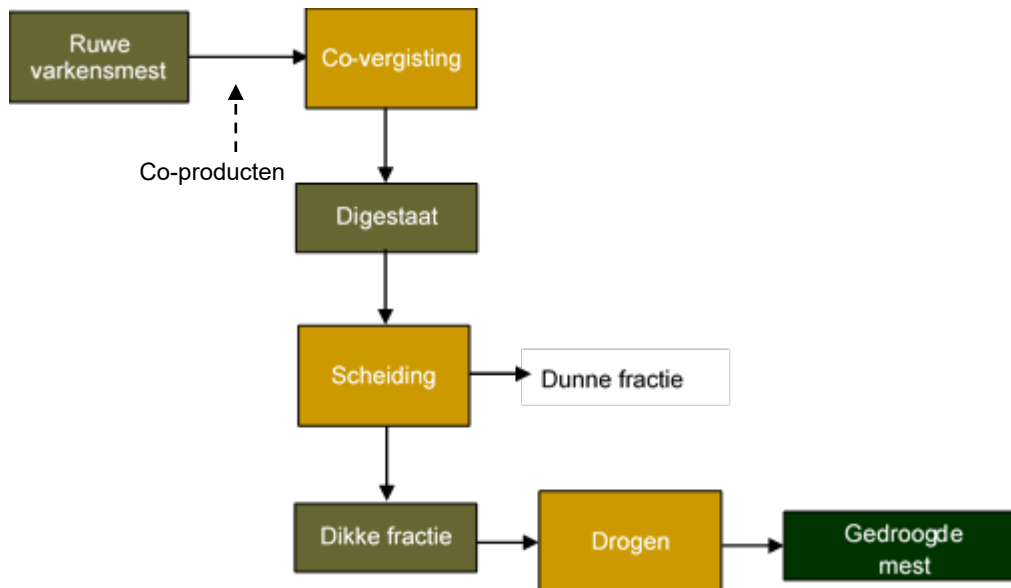
Compostering van dikke fractie van rundveemest vond plaats in een horizontale roterende composteertrommel. Deze had een inhoud van ca. 38 m³ bij een lengte van 12 m en een diameter van 2 m. De rotatiesnelheid bedroeg 0,8 omwentelingen per minuut. De composteertrommel werd semi-continu gevoed, waarbij elk uur vers materiaal werd ingevoerd. De verblijftijd van het materiaal in de trommel bedroeg ongeveer 2 dagen. De procestemperatuur varieerde tussen 60 tot 70 °C. Compostering van dikke fractie varkensmest vond plaats in een verticale composteersilo met een capaciteit van 90 m³ (h=6 m, Ø=5). De installatie werd dagelijks gevoed met batches van 9 ton vers materiaal. De verblijftijd bedroeg 10 dagen en de procestemperatuur 60-70 °C. Figuur 2.2 toont het processchema van compostering van de dikke fractie van varkensmest na mechanische scheiding.



Figuur 2.2 Schematische weergave van het proces van scheiding en compostering.

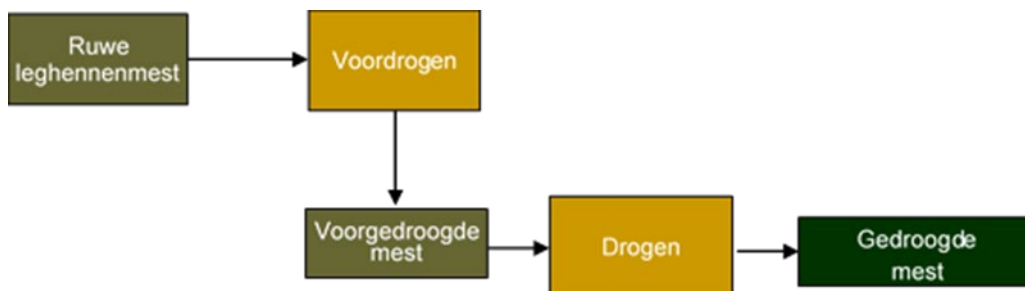
2.1.3 Drogen

Ruwe varkensmest werd samen met co-producten vergist waarna het digestaat mechanisch werd gescheiden in een dikke en dunne fractie. De dikke fractie werd vervolgens gedroogd door middel van een banddroger, bestaande uit een aantal boven elkaar geplaatste geperforeerde banden. Er werd gebruik gemaakt van restwarmte van een warmtekracht-installatie die werd gevoed met biogas uit mestvergisting. Warme lucht werd onder hoge druk in verticale richting door de mest op de geperforeerde banden geperst, resulterend in een eindproduct met 90-95% droge stof. Figuur 2.3 toont het processchema van achtereenvolgens vergisten, scheiden en drogen van dikke fractie.



Figuur 2.3 Schematische weergave van het proces van drogen van dikke fractie varkensmest na co-vergisting.

Pluimveemest, bestaande uit leghennenmest (opfokhennen), werd in de stal voorgedroogd tot een product van 40-50% droge stof. De voorgedroogde mest werd verder gedroogd middels een banddroger waarbij gebruik werd gemaakt van warme stallucht die onder hoge druk door de mest op de geperforeerde banden werd gestuurd, resulterend in een eindproduct met 85-90% droge stof. Figuur 2.4 toont het processchema van voordrogen en drogen van pluimveemest.

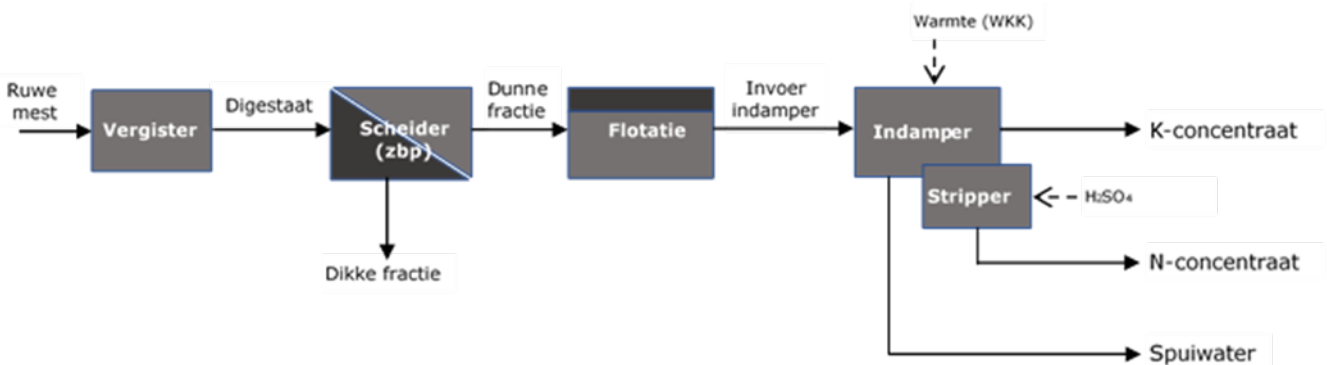


Figuur 2.4 Schematische weergave van het proces van drogen van voorgedroogde pluimveemest.

2.1.4 Indampen

De beschrijving van indampen is afgeleid van Hoeksma et al. (2021).

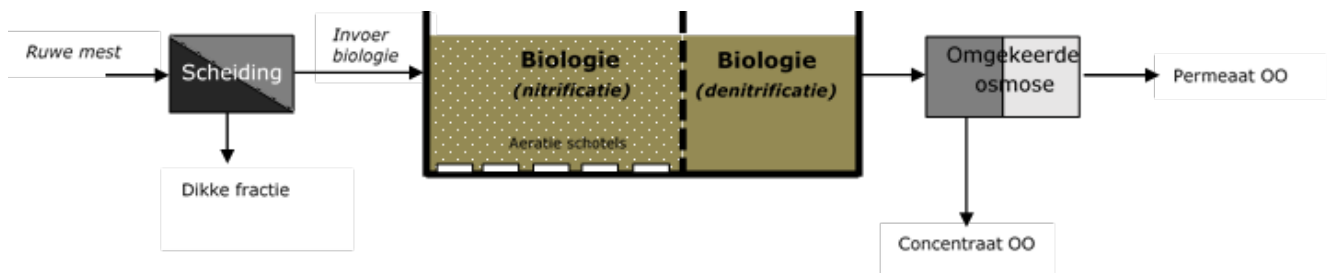
In de beschouwde installatie werd indampen toegepast voor het indikken van een dunne mestfractie. Deze ontstond na mechanische scheiding van digestaat (uit co-vergisting van varkensmest en bijproducten) d.m.v. een zeefbandpers gevolgd door flotatie. Er werd gebruik gemaakt van een vacuumindamper met damprecompressie, waarbij de benodigde energie werd verkregen uit warmte die vrijkomt bij omzetting van biogas in elektriciteit (warmtekrachtkoppeling). Bij deze vorm van indamping wordt in meerdere trappen gewerkt. De damp van de eerste trap wordt gebruikt als warmtebron voor de tweede trap enzovoort. Door afkoeling van de waterdamp ontstaat een condensaat dat vluchtige verbindingen bevat, met name ammoniak. Ammoniak werd uit het condensaat gestript door middel van een geïntegreerde stripper, onder toevoeging van zwavelzuur met als product ammoniumsulfaat. De ingedampte reststroom, het K-concentraat, bestond uit een vloeibaar product met een hoog gehalte aan kalium. Uit het indamp- en stripproces ontstond, naast een K-concentraat en een N-concentraat, spuiwater dat in een omgekeerde osmose installatie en een ionenwisselaar werd gezuiverd alvorens het werd geloosd op het oppervlaktewater. Figuur 2.5 toont het processchema van het mestverwerkingsysteem met indamping.



Figuur 2.5 Schematische weergave van het mestverwerkingsproces met indamping.

2.1.5 Biologische behandeling en OO

De biologische behandeling bestond uit een biologisch actief slib systeem, vergelijkbaar met de voorzuivering van kalvergiel met de processen nitrificatie en denitrificatie. Het effluent van deze behandeling werd gefilterd door middel van omgekeerde osmose (OO). Een OO-membraan is uiterst fijnmazig met een poriegrootte van maximaal 1 nm. Mestverwerking met als laatste stap OO levert een op oppervlaktewater losbaar permeaat op, mits de OO-unit op de juiste wijze is geconstrueerd en toegepast met zorgvuldige voorbehandeling van de ingaande mestvloestof en reiniging van de membranen. Figuur 2.6 toont het processchema van mestverwerking met biologische behandeling en omgekeerde osmose van het effluent.

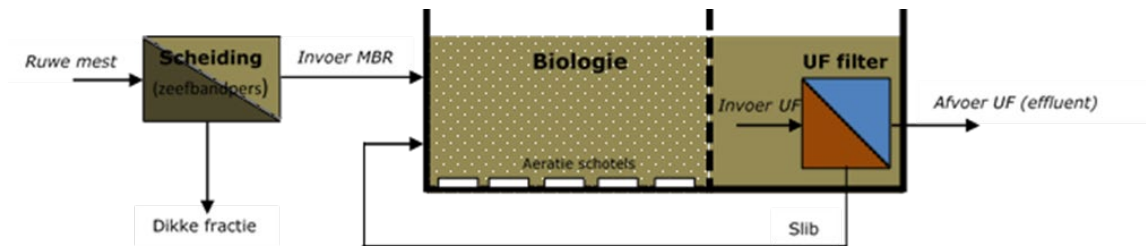


Figuur 2.6 Schematische weergave van het mestverwerkingsproces met biologische behandeling en omgekeerde osmose.

2.1.6 Membraanbioreactor met ultrafiltratie

De beschrijving van de membraanbioreactor met ultrafiltratie is afgeleid van Hoeksma et al. (2021). De membraanbioreactor bestond uit een koppeling van een biologisch actief slib systeem met ultrafiltratie. Een membraanbioreactor in combinatie met ultrafiltratie (MBR-UF) wordt bij slechts enkele mestverwerkingsinstallaties in Nederland toegepast. Een UF-membraan (max. 0,1 μm) is minder fijnmazig dan een OO-membraan (max. 1 nm). Een MBR-UF zou, eventueel in combinatie met aanvullende zuiveringstechnieken, net als bij OO een op oppervlaktewater loosbaar effluent op kunnen leveren.

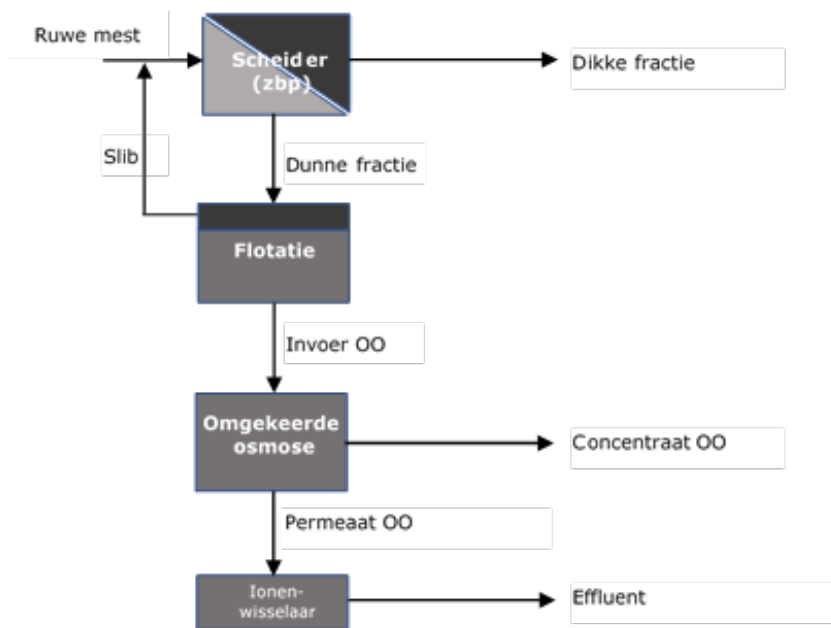
De installatie waaraan de metingen zijn gedaan was voorzien van een *submerged* UF filter, zoals schematisch weergegeven in Figuur 2.7.



Figuur 2.7 Schematische weergave van het mestverwerkingsproces met MBR-UF.

2.1.7 Omgekeerde osmose

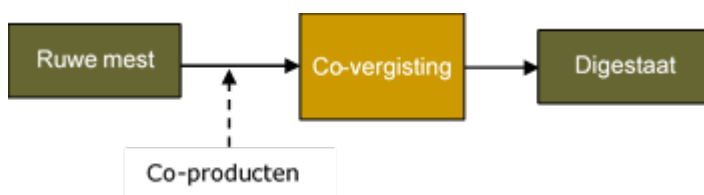
De beschrijving van omgekeerde osmose is afgeleid van Hoeksma et al. (2021). Omgekeerde osmose (OO) wordt toegepast om dunne mestfracties te zuiveren tot loosbaar water en een geconcentreerde zoutoplossing, het z.g. mineralenconcentraat. Bij de installatie waaraan de metingen zijn gedaan werd gebruik gemaakt van een meertraps OO-systeem en een nageschakelde ionenwisselaar (IW). De nabehandeling van het OO-permeaat met IW was nodig om lozing op oppervlaktewater mogelijk te maken. Het behandlingsproces begon met mechanische scheiding van de ruwe mest in een vaste en een vloeibare dunne fractie waarbij gebruik werd gemaakt van een zeefbandpers (zbp). Door middel van *dissolved air flotation* (DAF) werden vaste organische en anorganische delen uit de dunne mestfractie verwijderd om vervuiling en beschadiging van de OO-membranen te voorkomen. Om de kans op vervuiling en beschadiging van de membranen verder te verkleinen waren vóór de OO-unit twee papierfilters (40 μm) geplaatst. Figuur 2.8 toont het processchema van de verwerkingsinstallatie met omgekeerde osmose.



Figuur 2.8 Schematische weergave van het mestverwerkingsproces met omgekeerde osmose.

2.1.8 Vergisting

Vergisting vond plaats in een volledig gemengde reactor bij temperatuur variërend tussen 37 en 40° C. De gemiddelde verblijftijd bedroeg 20-25 dagen. De voeding van de vergisters bestond naast varkens- en rundveemest uit co-producten, waaronder energiemais en reststoffen uit de voedings- en genotmiddelenindustrie, alle voorkomend op de positieve lijst van co-producten, zoals neergelegd in Bijlage Aa., behorende bij artikel 4 van de Uitvoeringsregeling Meststoffenwet. Figuur 2.9 toont het processchema van vergisting van varkens- en rundveemest.



Figuur 2.9 Processchema van vergisting van varkens- en rundveemest.

2.2 Metingen

Monstername

De vloeibare processtromen werden bemonsterd via aftapkranen in de leidingen van de installaties. Dikke fracties werden bemonsterd direct na de scheiding waarbij 1 l materiaal werd verzameld vanaf de transportband. De monsters werden in een koelcel bij 4° C bewaard, de volgende dag gekoeld naar het laboratorium overgebracht waar de monsters dezelfde dag in onderzoek werden genomen.

Micro-organismen

Onderzocht is of mestverwerking invloed heeft op het voorkomen van de volgende micro-organismen, waarop Wageningen Bioveterinary Research (WBVR) in alle monsters kwalitatieve of kwantitatieve bepalingen heeft uitgevoerd:

Totaal kiemgetal (kwantitatief)
Kiemgetal <i>E. coli</i> (kwantitatief)
Kiemgetal <i>ESBL-E. coli</i> (kwantitatief)
<i>Salmonella</i> (kwalitatief)
<i>Campylobacter</i> (kwalitatief)

In het totaal kiemgetal zitten alle aerobe bacteriën inclusief het Gram-negatieve deel van de darmbacteriën die in staat zijn om onder aerobe condities te groeien. Hierbij horen in elk geval *E. coli* en *Salmonella*.

E. coli is een darmbacterie die doorgaans in hoge concentraties voorkomt in mest. *E. coli* is voor de mens (meestal) niet pathogeen, en kan naast het totaal kiemgetal worden gebruikt als indicator organisme om het effect van mestverwerking vast te stellen.

Salmonella en *Campylobacter* zijn zoönotische bacteriën en komen eveneens voor in darmen van dieren. Beide bacteriesoorten zijn een belangrijke oorzaak van voedselinfecties bij de mens.

ESBL-E. coli (Extended Spectrum Beta-Lactamase) is een enzym, geproduceerd door de darmbacterie *E. coli*, dat resistentie tegen beta-lactam antibiotica veroorzaakt. Hoewel dierlijke mest een beperkte bijdrage levert aan overdracht van ESBL's naar de mens wordt op verschillende manieren getracht het risico vanuit dierlijke bronnen verder te reduceren.

De bovengenoemde bacteriën zijn onderdeel van de verplichte AMR monitoring in landbouwhuisdieren als vast gelegd in het nieuwe Europese besluit: Commission Implementing Decision (EU) 2020/1729. De gebruikte analysemethoden voor de biologische parameters staan vermeld in Bijlage 1.

Antibiotica

Wageningen Food Safety Research (WFSR) heeft in alle monsters het gehalte van de volgende 11 antibiotica, die normaal in dierlijke mest kunnen worden aangetroffen, gemeten:

Antibioticum	Klasse
Oxytetracycline	Tetracyclines
Doxycycline	Tetracyclines
Sulfadiazine	Sulfonamides
Sulfadimidine	Sulfonamides
Trimethoprim	Foliumzuur synthese remmers
Ciprofloxacin	Chinolonen
Enrofloxacin	Chinolonen
Flumequine	Chinolonen
Lincomycine	Lincosamides
Tilmicosine	Macroliden
Florfenicol	Fenicolen

De gebruikte analysemethoden voor antibiotica staan vermeld in Bijlage 2.

De meetresultaten van bacteriën en antibiotica zijn integraal opgenomen in Tabel 2 resp. Tabel 3.

3 Resultaten en discussie

3.1 Micro-organismen

Tabel 2 toont de resultaten van de metingen van micro-organismen in de processtromen van de verschillende mestverwerkingsinstallaties. Van *E. coli*, *ESBL E. coli* en het totaal kiemgetal zijn de concentraties (CFU/gram) weergegeven. Van *Salmonella* en *Campylobacter* is aangegeven of ze wel of niet zijn aangetoond.

De resultaten laten zien dat de concentraties van bacteriën in de ruwe mest verschillen per mestsoort. De hoogste concentraties zijn gemeten in pluimveemest en kalvergier en lagere concentraties in varkens- en rundveemest, wat overeenkomt met metingen in eerder onderzoek van o.a. Schmitt et al. (2019). *E. coli* is in alle mestsoorten aangetroffen. *ESBL E. coli* is aangetroffen in kalvergier, varkensmest en pluimveemest, *Salmonella* en *Campylobacter* in kalvergier en varkensmest. *E. coli* en *ESBL-E. coli* komen voor in een verhouding van 100 : 1 tot 10.000 : 1.

Biologische voorzuivering van kalvergier heeft een reducerend effect op *E. coli*, *ESBL-E. coli*, *Salmonella* en *Campylobacter*. Na deze behandeling zijn de meeste niet meer aangetoond. Bij de tweede meting is *Salmonella* na biologische behandeling wel aangetoond in het slib en het effluent. Het totaal kiemgetal is na biologische behandeling met 1 log afgenomen. Door slibbezinking vindt een extra afname van 1 log plaats.

In de dikke fractie van varkensmest is vóór en na compostering *Salmonella* aangetroffen. In de dikke fractie van rundveemest zijn vóór compostering geen individuele bacteriën aangetoond, maar na compostering is *E. coli* in een aanzienlijke concentratie (log 5) aangetroffen. Het totaal kiemgetal van dikke fractie van rundveemest en varkensmest is na compostering met log 2 toegenomen. Deze resultaten wijzen op bacteriegroei tijdens het composteringsproces.

Drogen van pluimveemest, dat plaats vond bij relatief lage temperatuur, heeft weinig effect op het voorkomen van bacteriën. Het totaal kiemgetal en de concentratie *E. coli* blijven vrijwel gelijk. Opmerkelijk is dat de concentratie van *ESBL E. coli* met log 2 afgenomen is, terwijl eenzelfde trend als bij *E. coli* verwacht mocht worden. Vermoedelijk is hier sprake van een artefact. In de dikke fractie van varkensmest zijn geen *ESBL E. coli* en zoñotische bacteriën aangetoond. Het totale kiemgetal in de varkensmest is na drogen met log 2 toegenomen. Hieruit blijkt dat sommige micro-organismen het droogproces, dat plaatsvindt bij relatief lage temperatuur, kunnen overleven. Bij varkensmest werden in de invoer en de afvoer van de droger geen *E. coli* of *ESBL-E. coli* aangetoond, zodat geen uitspraken kunnen worden gedaan over het effect van drogen op deze bacteriën.

De resultaten laten geen effect zien van indampen van dunne fractie van vergiste varkensmest op de aanwezigheid van micro-organismen. Vóór en na indampen zijn geen individuele bacteriën aangetoond en het totaal kiemgetal is ongewijzigd.

De metingen aan MBR-UF laten zien dat de concentratie *E. coli* in de invoer MBR niet verschilt van de ruwe varkensmest en dat *Salmonella* en *Campylobacter* bij één van de bedrijven in beide stromen is aangetoond. In het effluent na ultrafiltratie (UF) is geen van de gemeten micro-organismen aangetroffen. De resultaten van MBR-OO laten zien dat in het effluent na OO eveneens geen micro-organismen zijn aangetroffen. Dus zowel MBR gecombineerd met OO als MBR gecombineerd met UF resulteert in totale verwijdering van de gemeten micro-organismen, wat feitelijk niet kan worden gesteld voor *Campylobacter* omdat die bij MBR-UF in geen van de processtromen werd aangetroffen. Het kiemgetal in de afvoer UF en in het permeaat OO van resp. log 5 en log 4 zijn hoger dan verwacht. Bacteriën kunnen in theorie UF- en OO-membranen niet passeren gezien de kleinere poriegrootte van beide t.o.v. de grootte van de micro-organismen. Daarom zouden na deze behandelingen effluenten mogen worden verwacht die vrij zijn van bacteriën. Het permeaat van de tweede OO-installatie, waarin geen van de gemeten micro-organismen is aangetoond, voldoet aan

deze verwachting. Constructie, voorbehandeling van de invoer en onderhoud van de membranen zijn kritische factoren voor de effectiviteit van de installaties (Hoeksma et al., 2011).

Het verwerkingsproces met omgekeerde osmose en varkensmest als uitgangsmateriaal resulteert in een 'schoon' permeaat vrij van bacteriën en een dikke fractie en concentraat OO waarin wel bacteriën aanwezig zijn. Uit eerder onderzoek is gebleken dat de totale hoeveelheid micro-organismen in de drie eindproducten van dit verwerkingsproces vrijwel gelijk is aan de hoeveelheid in de oorspronkelijke varkensmest; per saldo vindt geen duidelijke reductie van het aantal micro-organismen plaats (Hoeksma et al., 2015).

Vergisting heeft een reducerend effect op het voorkomen van *E. coli*, *ESBL-E. coli* en *Salmonella* in varkensmest. In de vergiste mest zijn deze micro-organismen niet meer aangetroffen. Het effect van vergisting op het totaal kiemgetal is nihil. Het effect van vergisting van rundveemest is niet éénduidig voor alle bacteriën; *E. coli* wordt volledig verwijderd, terwijl voor *ESBL-E. coli* en het totaal kiemgetal geen effect gemeten is.

De bepalingen van het totaal kiemgetal hebben in alle gevallen meetwaarden ruim boven de aantoonbaarheidsgrens opgeleverd, wat niet het geval is voor de kwantitatieve bepalingen van de afzonderlijke bacteriën. Voor dit onderzoek is het totaal kiemgetal daarom de beste maat om de reductie van het totaal aantal bacteriën in de mest en het effect van de verschillende verwerkingsmethoden vast te stellen.

De kwantitatieve bepalingen hebben voor *E. coli* geresulteerd in een aanzienlijk aantal meetwaarden onder de aantoonbaarheidsgrens. Dit is het gevolg van de relatieve ongevoeligheid van de in dit onderzoek toegepaste analysemethode. Voor *E. coli* is een kiemtelling ingezet volgens de *running drop* methode waarmee kiemgetallen $> 10^3$ CFU/ml kunnen worden aangetoond. Bij de keuze van deze methode is er vanuit gegaan dat in dierlijke mest altijd meetbare concentraties *E. coli* worden aangetroffen. In de monsters van de ruwe mest en mestfracties van varkens en rundvee blijkt dat echter niet het geval te zijn, waardoor geen duidelijk beeld is gekregen van het effect van verwerking van deze mest op *E. coli*. Achteraf gezien was een analysemethode met een lagere aantoonbaarheidsgrens meer geschikt geweest.

Uit het beperkte aantal waarnemingen kunnen geen harde conclusies worden getrokken maar deze verkennende studie heeft wel waardevolle indicaties opgeleverd over welke mestverwerkingstechnieken een bijdrage kunnen leveren aan het beperken van introductie en verspreiding van pathogenen en resistente bacteriën in het milieu via dierlijke mest. Uit de metingen komt een gevarieerd beeld naar voren wat betreft het effect van biologische behandeling en vergisting. Compostering resulteert in een toename van het aantal (aerobe) bacteriën. Drogen en indampen lijken weinig effect te hebben. De waarnemingen wijzen erop dat membraanbioreactoren in combinatie met ultrafiltratie en omgekeerde osmose een sterk reducerend effect op micro-organismen hebben en dus verspreiding van pathogenen en resistentie in het milieu kunnen beperken.

Tabel 2 Resultaten van de kwantitatieve en kwalitatieve bepalingen van micro-organismen in de processtromen van verschillende mestverwerkingstechnieken. Voor ESBL-E. coli is zowel een kiemtelling (kwantitatief) ingezet als een ophoping (kwalitatief). Wanneer de kiemtelling negatief was en de ophoping positief is in dat geval wel ESBL-E. coli aangetoond, maar was het oorspronkelijke kiemgetal < 10³ CFU/ml. Aantoonbaarheidsgrenzen: totaal kiemgetal 10³ CFU/gram, E. coli 10³ CFU/gram, ESBL E. coli kiemtelling 10³ CFU/ml, ESBL E. coli ophoping 10 CFU/gram, Campylobacter sp. 10 CFU/gram, Salmonella sp. 0,2 CFU/gram.

Techniek	Mestsoort	Processtroom	Datum bemonstering	Totaal kiemgetal (CFU/gram)	E. coli (CFU/gram)	ESBL E. coli (CFU/gram)	Salmonella	Campylobacter
Biologische voorzuivering	kalvergier	ruwe mest	14-10-2019	10 ⁷	10 ⁵	aangetoond (<10 ³)	aangetoond	niet aangetoond
		slib	14-10-2019	10 ⁶	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
		effluent	14-10-2019	10 ⁵	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
	kalvergier	ruwe mest	9-3-2020	10 ⁶	10 ⁵	aangetoond (<10 ³)	aangetoond	aangetoond
		slib	9-3-2020	10 ⁵	< 10 ³	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
		effluent	9-3-2020	10 ⁴	< 10 ³	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
Compostering	rundveemest	dikke fractie	12-11-2019	10 ⁶	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
		gecomposteerde mest	12-11-2019	10 ⁸	10 ⁵	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
	varkensmest	dikke fractie	2-12-2019	10 ⁵	< 10 ³	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
		gecomposteerde mest	2-12-2019	10 ⁷	< 10 ³	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
Drogen	pluimveemest	voorgedroogde mest	5-11-2019	10 ⁹	10 ⁸	aangetoond (10 ⁶)	niet aangetoond	niet aangetoond
		gedroogde mest	5-11-2019	10 ¹⁰	10 ⁸	aangetoond (10 ⁴)	niet aangetoond	niet aangetoond
	varkensmest (vergist)	dikke fractie	2-12-2019	10 ⁴	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
		gedroogde mest	2-12-2019	10 ⁶	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
Indampen	varkensmest	dunne fractie	18-2-2020	10 ⁶	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
		spuiwater	18-2-2020	10 ⁶	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
Membraan bioreactor + UF	varkensmest	ruwe mest	19-11-2019	10 ⁶	10 ³	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
		dikke fractie	19-11-2019	10 ⁵	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
		invoer MBR	19-11-2019	10 ⁵	10 ³	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
		afvoer UF	19-11-2019	10 ⁵	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
Membraan bioreactor + OO	varkensmest	ruwe mest	11-2-2020	10 ⁶	10 ⁴	aangetoond (<10 ³)	aangetoond	aangetoond

Techniek	Mestsoort	Processtroom	Datum bemonstering	Totaal kiemgetal (CFU/gram)	E. coli (CFU/gram)	ESBL E. coli (CFU/gram)	Salmonella	Campylobacter
		invoer MBR	11-2-2020	10 ⁵	10 ³	niet aangetoond	aangetoond	aangetoond
		concentraat OO	11-2-2020	10 ⁴	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
		permeaat OO	11-2-2020	10 ⁴	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
Omgekeerde osmose	varkensmest	ruwe mest	21-10-2019	10 ⁵	10 ³	niet aangetoond	aangetoond	aangetoond
		dikke fractie	21-10-2019	10 ⁵	< 10 ³	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
		invoer OO	21-10-2019	10 ⁵	10 ⁴	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
		concentraat OO	21-10-2019	10 ⁶	10 ⁴	niet aangetoond	aangetoond	niet aangetoond
		permeaat OO	21-10-2019	< 10 ³	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
Vergisting	varkensmest	ruwe mest	29-10-2019	10 ⁶	10 ⁴	aangetoond (<10 ³)	aangetoond	niet aangetoond
		vergiste mest	29-10-2019	10 ⁶	< 10 ³	niet aangetoond	niet aangetoond	niet aangetoond
	rundveemest	ruwe mest	5-2-2020	10 ⁸	10 ⁴	aangetoond (<10 ³)	niet aangetoond	niet aangetoond
		vergiste mest	5-2-2020	10 ⁸	< 10 ³	aangetoond (<10 ³)	niet aangetoond	niet aangetoond

3.2 Antibiotica

Tabel 3 toont de resultaten van de metingen van antibiotica residuen in de processtromen van de verschillende mestverwerkingsinstallaties.

Ten opzichte van de andere betrokken mestsoorten is in kalvergier een grotere verscheidenheid aan antibiotica aangetroffen. In onbewerkte kalvergier werden tetracyclines, sulfonamiden, chinolonen en macroliden gemeten. In varkens- en rundveemest waren dit vooral tetracyclines en sulfonamiden, in pluimveemest uitsluitend doxycycline. Lincosamides en trimethoprim zijn niet aangetoond. De hoogste gehalten antibiotica zijn gemeten in kalvergier en varkensmest. Dit beeld was te verwachten gezien het gebruik van middelen in de verschillende diersectoren, het residu (wat tot 70% kan bedragen) dat via uitscheiding in de mest terecht komt en de persistentie van de stoffen in de mestkelder (Lahr et al., 2019).

Veel antibiotica, met name tetracyclines, flumequine (een chinolon) en tilmicosin (een macrolide), adsorberen aan vaste deeltjes waardoor ze na scheiding van de mest grotendeels in de dikke fractie terecht komen. Dunne fracties en effluenten tonen aanzienlijk lagere gehalten aan antibiotica dan slib en dikke fracties. Scheiding is dus een effectieve techniek voor het verwijderen van antibiotica uit vloeibare mest.

Biologische voorzuivering en slibbezinking van kalvergier reduceert flumequine met bijna 70% en tilmicosine met 85%. De reductie van oxytetracycline en doxycycline bedraagt ca. 95%, sulfadiazine en sulfadimidine worden bijna volledig verwijderd. Oxytetracycline, doxycycline en flumequine zijn in hoge concentraties in het slib teruggevonden. Het reducerend effect voor deze stoffen moet dus vooral aan bezinking worden toegeschreven. De concentraties van sulfadiazine, sulfadimidine en tilmicosine zijn in het slib lager dan in de ruwe kalvergier. Dit duidt erop dat deze stoffen tijdens de behandeling worden afgebroken.

Compostering van rundvee- en varkensmest heeft een sterk reducerend effect op oxytetracycline resp. doxycycline. In de gecomposteerde mest zijn beide stoffen niet aangetoond.

Over het effect van drogen op de gemeten antibiotica kan geen uitspraak worden gedaan aangezien op één na alle meetwaarden onder de detectiegrens lagen. Alleen doxycycline werd aangetoond in de ruwe pluimveemest, zij het in een lage concentratie. In het gedroogde materiaal is doxycycline niet aangetroffen.

Er kan geen stellige uitspraak worden gedaan over het effect van indampen wegens het geringe aantal meetwaarden boven de detectiegrens van de invoer en de afvoer van de indamper. In de invoer zijn slechts lage concentraties doxycycline en sulfadiazine aangetoond. In de afvoer van de indamper werd tilmicosine aangetroffen. In het permeaat na OO behandeling zijn geen antibiotica aangetoond.

De concentraties van antibiotica in de processtromen van de membraanbioreactoren laten zien dat de eerste processtap, de scheiding, een sterk reducerend effect heeft, dat het effect van de biologische behandeling slechts marginaal is en dat de afvoer van UF en het permeaat OO vrij zijn van antibiotica. Dat in het permeaat OO tilmicosine is aangetroffen duidt op een artefact.

Het scheidingsproces voorafgaand aan omgekeerde osmose toont wederom het sterk reducerend effect van scheiding voor oxytetracycline en doxycycline. Deze stoffen komen terecht in de dikke fractie. Het effect van scheiding op sulfadiazine is minder duidelijk daar zowel in de dikke als in de dunne fractie lagere resp. gelijke concentraties zijn gemeten. Dit is te verklaren door afbraak van deze stof tijdens het verwerkingsproces, wat ook bij biologische behandeling van kalvergier is waargenomen. Omgekeerde osmose zorgt vervolgens voor volledige verwijdering van stoffen uit de dunne mestvloeistof en resulteert in een 'schoon' permeaat, vrij van antibiotica. Indien het mestverwerkingsproces, met omgekeerde osmose als laatste behandelingsstap, optimaal is ontworpen en op de juiste wijze wordt uitgevoerd, met voldoende aandacht voor onderhoud en reiniging van de OO-membranen, kan het permeaat op het oppervlaktewater worden geloosd.

Vergisting heeft geen effect op oxytetracycline en doxycycline. De waarneming dat vergiste rundveemest iets hogere concentraties laat zien dan ruwe rundveemest is toe te schrijven aan

onnauwkeurigheid van de bemonstering. Sulfadiazine in varkensmest blijkt tijdens vergisting te worden afgebroken.

Concluderend kan worden gesteld dat mestscheiding een effectieve manier is om antibiotica, die aan vaste deeltjes adsorberen zoals tetracyclines, chinolonen en macroliden, uit vloeibare mest te verwijderen en in de vaste fractie te concentreren. Omgekeerde osmose is een effectieve techniek voor het verkrijgen van een antibioticavrij effluent.

Techniek	Mestsoort	Processtroom	Datum bemonstering	Oxytetracycline	Doxycycline	Sulfadiazine	Sulfadimidine	Trimethoprim	Ciprofloxacin	Enrofloxacin	Flumequine	Lincomycine	Tilmicosine	Florfenicol
Membraan bioreactor + OO	varkensmest	ruwe mest	11-2-2020	<10	230	<1	<1	<1	<3	<10	<5	<1	<1	<1
		invoer MBR	11-2-2020	<3	26	<1	<1	<1	<2	<5	<5	<1	<1	<1
		concentraat OO	11-2-2020	<3	<3	<1	<1	<1	<1	<2	<2	<1	7	<1
		permeaat OO	11-2-2020	<20	<10	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	94	<1
Omgekeerde osmose	varkensmest	ruwe mest	21-10-2019	41	140	31	<1	<1	<2	<2	2	<1	<10	<1
		dikke fractie	21-10-2019	280	1000	4	<1	<1	<10	<10	3	<1	<10	<1
		invoer OO	21-10-2019	<15	44	9	<1	<1	<5	<1	<1	<1	<10	<1
		concentraat OO	21-10-2019	42	55	21	<1	<1	<5	<2	2	<1	<10	<1
Vergisting	varkensmest	ruwe mest	29-10-2019	<5	60	580	<1	13	<2	<5	<3	<1	<1	<1
		vergiste mest	29-10-2019	<10	87	3	<1	<2	<10	<15	<15	<2	<1	<1
	rundveemest	ruwe mest	5-2-2020	5	<5	8	<1	<1	<5	<10	<3	<1	<1	<1
		vergiste mest	5-2-2020	23	<5	26	<1	<1	<3	<10	<3	<1	<1	<1

NTB = Niet Te Bepalen

Literatuur

Hoeksma P., F.E. de Buisonjé, P.A.I. Ehlert en J.H. Horrevorts (2011) Mineralenconcentraten uit dierlijke mest. Monitoring in het kader van de pilot mineralenconcentraten. Wageningen Livestock Research Rapport 481.

Hoeksma P., A.J.A. Aarnink, F.E. de Buisonjé, S.A. Rutjes en H. Blaak (2015) Effect van processtappen op overleving van micro-organismen bij mestverwerking. Wageningen Livestock Research Rapport 893.

Hoeksma P., A. Aarnink, T. de Koeijer, P.W. Blokland, L. Wipfler, N. Rakonjac, C. Moermond en J. Lahr (2020) Milieurisico van antibiotica in mest voor bodem en grondwater beperkt. Tijdschrift Milieu 2020; juni: 46-52.

Hoeksma P., H. Schmitt, F. de Buisonjé, H. Pishgar Komleh and P. Ehlert (2021) Quality of mineral concentrates. Results of monitoring plants of the Pilot Mineral Concentrate in 2019-2020. Wageningen Livestock Research Report 1295.

Lahr et al (2019) Diergeneesmiddelen in het milieu. Een synthese van de huidige kennis. Stowa Rapport 2019 26.

Schmitt et al (2019) Antibioticaresistente bacteriën, resistentiegenen, en antibioticaresiduen in mest. RIVM Briefrapport 2019 - 0112

Bijlage 1

Analysemethoden micro-organismen

Totaal kiemgetal, E. coli en ESBL E. coli; Kwantitatief

- * Weeg 1 gram materiaal af, of als het materiaal vloeibaar is, neem 1 ml.
- * Voeg 9 ml Pepton glycerol toe en meng goed op de vortex.
- * Pipetteer 180 µl fysiologische zoutoplossing in de kolommen 3, 5, 7, 9 en 11 van een 96 well plaat
- * Pipetteer in het 1ste welletje van kolom 1 100 µl sample sample 1.
- * Pipetteer in het 2de welletje van kolom 1 100 µl sample sample 2, etc.
- * Verdun, met een multichannel, de monsters met 10-voudige verdunningsstappen door, door 20 µl vanuit kolom 1 in kolom 3 te pipetteren, neem nieuwe puntjes, meng kolom 3 en breng 20 µl over naar kolom 5, etc.
- * Breng 10 µl monsterverdunning op de agar aan 1 zijde van de 4-kante plaat (HIS, McConkey en McConkey+1mg/l cefotaxime
- * Zet de platen schuin op de standaard met de druppel aan de bovenzijde
- * Laat de druppel over de plaat naar beneden lopen (*running drop*)
- * Incubeer de platen o/n bij 37°C

ESBL E. coli isolatie; Kwalitatief

- *Ontdooi de 10% suspensies van de monsters
- *Breng 1ml 10% suspensie in 9ml gebufferd pepton water
- *o/n incuberen bij 37°C
- *10µl enten op een MacConkey + 1mg/l cefotaxime
- *o/n incuberen bij 37°C
- * Bevestig verdachte kolonies m.b.v. een MaldiTof typering

Campylobacter isolatie: Kwalitatief

- *Weeg 1 gram materiaal af, of als het materiaal vloeibaar is, neem 1 ml.
- *Voeg 9 ml Preston medium toe en meng goed op de vortex.
- *Incubeer o/n bij 42°C
- *Ent de buizen af op CCDA platen
- *Incubeer de platen 48h bij 42°C
- * Bevestig verdachte kolonies m.b.v. een MaldiTof typering

Salmonella isolatie: Kwalitatief, volgens ISO 6579-1:2017

- *Ent 1 gram materiaal af in een buis met 9 ml BPW. En meng goed op de vortex.
- *Incubeer 18 uur ± 2 uur bij 37°C.
- *Enten de BPW buizen af op MRSV platen door 3 druppels van de geïncubeerde BPW cultuur (3 druppels zijn samen ongeveer 0,1 ml) goed verspreid op de plaat te brengen. Neem het monster zo dicht mogelijk aan de oppervlakte van de BPW maar wel goed onder het eventuele materiaal dat in de buis drijft.
- *Incubeer de MSRv gedurende 24 uur ± 3 uur bij 41,5°C.
- *Maak een subcultuur van de positieve MSRv plaat op XLD en BGA.
- *Bebroed negatieve MSRv platen nogmaals gedurende 24 uur ± 3 uur bij 41,5°C.
- *Bevestig een verdachte kolonies m.b.v. een MaldiTof typering.

Bijlage 2

Analysemethoden antibiotica

De bevestiging van de identiteit van antibiotica werd uitgevoerd in overeenstemming met Besluit EC 2002/657/EC. Alle componenten werden simultaan geanalyseerd. Ruwe monsters en testmonsters werden bewaard bij $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Voorbehandeling en meting:

De monsters werden geëxtraheerd met McIlvain buffer en acetonitril waarna eiwitten werden neergeslagen met lood acetaat. Na centrifugeren werd het lood verwijderd met EDTA. De extracten werden gescheiden over een Reversed Phase SPE kolom waarna de componenten werden gewassen met een methanol/water mengsel. Na indampen, oplossen en zonodig centrifugeren werden de extracten gemeten met LC-MS/MS (Waters Acquity LC) met de volgende onderdelen:

Analytische kolom: Kinetex 1.7 μ C18 100A, 100*2,1 mm

Massa spectrometer: AB Sciex QTrap6500 voorzien van een ESI-interface.

Alle reagentia waren van pro-analyse kwaliteit of hoger. Water werd gezuiverd over een MilliQ® installatie met een minimale resistantie van $18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$.

Voor elke serie analyses (10-20 monsters) werd een serie blanco's (een matrix die correspondeert met de te analyseren monsters) meegenomen met variërende toevoegingen, afhankelijk van de uit te voeren identificatie en kwantificatie van de monsters.

Ontdoide monsters werden gehomogeniseerd door roeren met een spatel. De omvang van een testmonster bedroeg $2 \pm 0,05$ gram.

Alle monsters werden in duplo geanalyseerd. Het tweede monster bevatte een toevoeging op detectieniveau of op twee maal detectieniveau indien de gevoeligheid daarom vroeg.

Twee gram werd ingewogen in een 50 ml buis. Aan alle monsters en blanco's werd een interne standaard-oplossing toegevoegd. Na 20 minuten rust werd McIlvain-buffer en vervolgens na krachtig schudden acetonitril bevattend TFA toegevoegd. Alle monsters werden 5 minuten in een mixer geplaatst. Loodacetaat oplossing werd toegevoegd, krachtig geschud en vervolgens op hoog niveau gecentrifugeerd. Het supernatant werd uitgegoten in een glazen buis. Acetonitril werd verwijderd in een stikstofstroom op $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. EDTA-solution werd toegevoegd waarna het complete monster werd gescheiden over een geconditioneerde SPE-kolom. De kolom werd gewassen en geëluëerd. De monsters werden ingedampt door middel van een stikstofstroom op $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Het residu werd opgelost in een water/methanol mengsel. De monsters werden indien nodig gefilterd.

Vóór aanvang van de analyse met LC-MS/MS werden de gevoeligheid en de retentietijd van de componenten gecheckt met gebruik van een standaard oplosmiddel en de lage MMS door middel van signaal-ruis verhouding. Wanneer hoge concentraties werden verwacht werd extra oplosmiddel gebruikt.

De detectielimiet (LOD) verschilde per monster en was afhankelijk van de hoeveelheid ingewogen materiaal; hoe kleiner de ingewogen hoeveelheid, hoe hoger de detectielimiet.

Data verwerking:

Voor de dataverwerking werd per antibioticagroep een berekeningsheet gebruikt. De LOD werd voor elk individueel monster vastgesteld op basis van de respons van de interne standaard in combinatie met de signaal-ruis ratio van de standaardlijn (MMS). De gevonden concentratie in het monster werd vergeleken met de LOD en gerapporteerd als positief (met een concentratie) of negatief ($<\text{LOD}$).

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



Wageningen Livestock Research
Postbus 338
6700 AH Wageningen
T 0317 48 39 53
E info.livestockresearch@wur.nl
www.wur.nl/livestock-research

Wageningen Livestock Research ontwikkelt kennis voor een zorgvuldige en renderende veehouderij, vertaalt deze naar praktijkgerichte oplossingen en innovaties, en zorgt voor doorstroming van deze kennis. Onze wetenschappelijke kennis op het gebied van veehouderijsystemen en van voeding, genetica, welzijn en milieu-impact van landbouwhuisdieren integreren we, samen met onze klanten, tot veehouderijconcepten voor de 21e eeuw.

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.500 medewerkers en 10.000 studenten behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

