

RAPPORT
BACTERIËLE ANTIBIOTISCHE
RESISTENTIE EN
BODEMKWALITEIT

RAPPORT
BACTERIËLE ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE EN
BODEMKWALITEIT

Ir. M. Zuidema
Ir. A.E. Klein

TNO-SCMO
Postbus 6013
2600 JA Delft
Telefoon 015-696889

TCB R01(1993)

Leidschendam,
juli 1993

Technische commissie bodembescherming, Postbus 30947, 2500 GX Den Haag,
telefoon 070-3393034

VOORWOORD

De milieubelasting die voortvloeit uit de veehouderij in Nederland wordt meestal binnen de thema's "verzuring" en "vermesting" besproken. De gekozen invalshoek leidt ertoe dat overmatige aanvoer van macronutriënten, zoals fosfaat, nitraat, ammonium en in mindere mate kalium in het beleid de meeste aandacht krijgen. Met een eerdere studie (Berekening van zware-metaalbalansen voor de bodem*) heeft de commissie aangegeven dat op termijn de overmatige aanvoer van andere stoffen, met name zware metalen via dierlijke mest, overige organische meststoffen en kunstmest eveneens aandacht verdienen. In regelingen met betrekking tot overige organische meststoffen en compost zijn inmiddels zodanige regels gesteld dat accumulatie van zware metalen op de lange termijn in de bodem kan worden voorkomen.

Met betrekking tot dierlijke mest zijn de gebruiksregels tot nu toe vooral geënt op fosfaat waarbij thans wordt bezien in hoeverre deze regels, die geleidelijk worden aangescherpt, voldoende zijn om accumulatie in de bodem van andere stoffen te voorkomen. Het beeld van de mogelijke effecten van het gebruik van dierlijke mest op het milieu zou echter niet compleet zijn zonder een nadere analyse van de additieven die aan veevoer worden toegevoegd en die via dierlijke mest op de bodem worden gebracht. Met name dringt de vraag zich op naar de effecten van antibiotica die aan veevoer worden toegevoegd om te voorkomen dat bepaalde ziekten onder het vee uitbreken. De analogie met het gebruik van gewasbeschermingsmiddelen in de landbouw en de nadelige neveneffecten daarvan dringt zich hier op.

Vergelijkbaar met bestrijdingsmiddelen zullen antibiotica die via mest op de bodem terecht komen, neveneffecten kunnen hebben op de microflora in de bodem en op een aantal bodemprocessen die door bodembacteriën in stand worden gehouden. Naast dit directe effect kan het gebruik van antibiotica resistentie induceren bij microorganismen, die daarmee ongevoelig worden voor het betreffende antibioticum. Bijzonder voor bacteriën is voorts dat deze resistenties gelegen zijn op erfelijk materiaal dat gemakkelijk binnen, maar ook tussen verschillende bacteriesoorten kan worden uitgewisseld. Veelvuldig gebruik van een antibioticum kan dus leiden tot een verspreiding


* TCB A89/01-R Rapport "Berekening van zware-metaalbalansen voor de bodem", januari 1989.

van resistentie factoren en uiteindelijk tot het onbruikbaar worden van het betreffende antibioticum, ook voor andere doeleinden dan het beschermen van het vee.

De verkenning van deze problematiek die in het voorliggende rapport is gemaakt wijst uit dat bovenvermelde consequenties van het antibiotica gebruik in de veehouderij niet zijn uit te sluiten. Er is echter te weinig kennis om aan te geven hoe groot de risico's zijn. De commissie is naar aanleiding van de resultaten van deze studie en van een aantal eerdere vergelijkbare studies van oordeel dat er meer onderzoek over deze problematiek uitgevoerd zou moeten worden. Tevens zou een zekere terughoudendheid bij het gebruik van antibiotica op zijn plaats zijn. In het licht van de zorg waarmee de introductie van genetisch gemodificeerde (micro)organismen in het milieu wordt omringd lijkt aandacht voor de genetische modificatie van microorganismen die reeds in het milieu aanwezig zeker op zijn plaats.

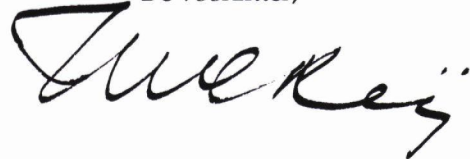
Namens de commissie,

De secretaris,



Dr. J.J. Vegter.

De voorzitter,



Ir. W.C. Reij.

INHOUD

SAMENVATTING

1. INLEIDING	1
2. VETERINAIR GEBRUIK ANTIBIOTICA	5
2.1 Vormen van toediening antibiotica	5
2.2 Hoeveelheid toegediende antibiotica	6
3. VERSPREIDING VAN ANTIBIOTICA	11
3.1 Antibiotica in het dier	11
3.2 Antibiotica in dierlijke produkten	11
3.3 Antibiotica in de mest	12
3.4 Antibiotica in de bodem	13
3.5 Verspreiding antibiotica vanuit de bodem	16
4. BACTERIËLE ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE	19
4.1 Ontstaan van bacteriële antibiotische resistentie	19
4.2 Factoren die de instandhouding van antibiotischE resistentie beïnvloeden	20
5. VERSPREIDING VAN ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE IN HET MILIEU	23
5.1 Bacteriële antibiotische resistentie in de mest	23
5.2 Bacteriële antibiotische resistentie in de bodem	24
5.3 Verspreiding van de bacteriële antibiotische resistentie vanuit de bodem naar het grondwater en/of oppervlaktewater	26
6. DISCUSSIE	29
7. LITERATUUR	33
BIJLAGEN	37

SAMENVATTING

In opdracht van de Technische commissie bodembescherming (TCB) is een verkennende literatuurstudie verricht naar de mogelijke gevolgen van het verspreiden van bacteriële antibiotische resistentie via de bodem. Er is een overzicht gegeven van de kennis uit de toegepaste sfeer in relatie tot de bodembescherming.

In eerste instantie is:

- in de vorm van een figuur een overzicht gegeven langs welke wegen de aan het vee toegediende antibiotica en de resistente bacteriën zich via de bodem kunnen verspreiden en uiteindelijk de mens kunnen bereiken;
- gekeken naar de manieren van toediening en de gebruikte hoeveelheden van antibiotica binnen de veterinaire sector;
- gekeken naar het voorkomen van antibiotica in dieren, dierlijke producten, mest, bodem en verspreiding vanuit de bodem.

Tenslotte is een eerste aanzet gemaakt van een inventarisatie van de bestaande kennis op het gebied van de bacteriële resistentievorming, -overdracht, en -verspreiding. Het blijkt dat met betrekking tot deze laatste aspecten er een leemte in kennis bestaat tussen de fundamentele medische microbiologie en de milieuwetenschappen (gedrag van resistentiefactoren in het milieu).

Zonder nader onderzoek hieromtrent is een juiste en gedetailleerde inschatting van de risico's die antibiotica veroorzaken door hun verspreiding via de bodem vrijwel niet mogelijk.

1. INLEIDING

Grote hoeveelheden antibiotica worden toegediend aan de veestapel als preventieve of curatieve maatregel tegen infectieziekten en voor de groeibevordering. Voorzover de middelen niet worden afgebroken of opgenomen in het dier, komen ze in de oorspronkelijke of gemetaboliseerde vorm in de mest en via het uitrijden in de bodem.

De antimicrobiële en toxicologische eigenschappen van de antibiotica kunnen de ecologische processen in de bodem of het oppervlaktewater verstoren.

Het voorliggende rapport richt zich op een ander probleem, namelijk het risico van resistentievorming en -overdracht in bacteriën. De problematiek is gecompliceerd omdat men zowel met de verspreiding van de stof (antibiotica), als met de verspreiding van de effecten van de stof te maken heeft. Het effect, het resistent worden van micro-organismen, kan zich autonoom verspreiden door overdracht van resistentie factoren tussen verschillende soorten micro-organismen. Bodem micro-organismen kunnen dan besmet worden met resistentiefactoren uit bacteriën in mest. De verspreiding van resistentie kan uiteindelijk tot blootstelling van mensen aan resistente bacteriën leiden. Indien dit voor de mens pathogene bacteriën betreft, bestaat het gevaar dat bij besmetting de voorgeschreven antibiotica niet meer werken (De Roij & De Vries, 1980).

Naast de chromosomale resistentie, een resistentie tegen één antibioticum (monoresistentie) die ontstaat door mutatie en overgaat van moeder-op dochtercellen, is er een overdraagbare vorm van resistentie. Deze is gesitueerd op R-plasmiden (plasmiden zijn stukken extrachromosomaal DNA die onafhankelijk van het chromosomale DNA repliceren), die horizontaal van de ene cel op de andere kunnen worden overgedragen. Deze overdracht vindt niet alleen plaats tussen gelijksoortige micro-organismen, maar ook tussen exemplaren van verschillende soorten (spectrumbreedte van de resistentie). De R-plasmiden kunnen genen bevatten die coderen voor resistentie tegen meerdere antibiotica (multiresistentie).

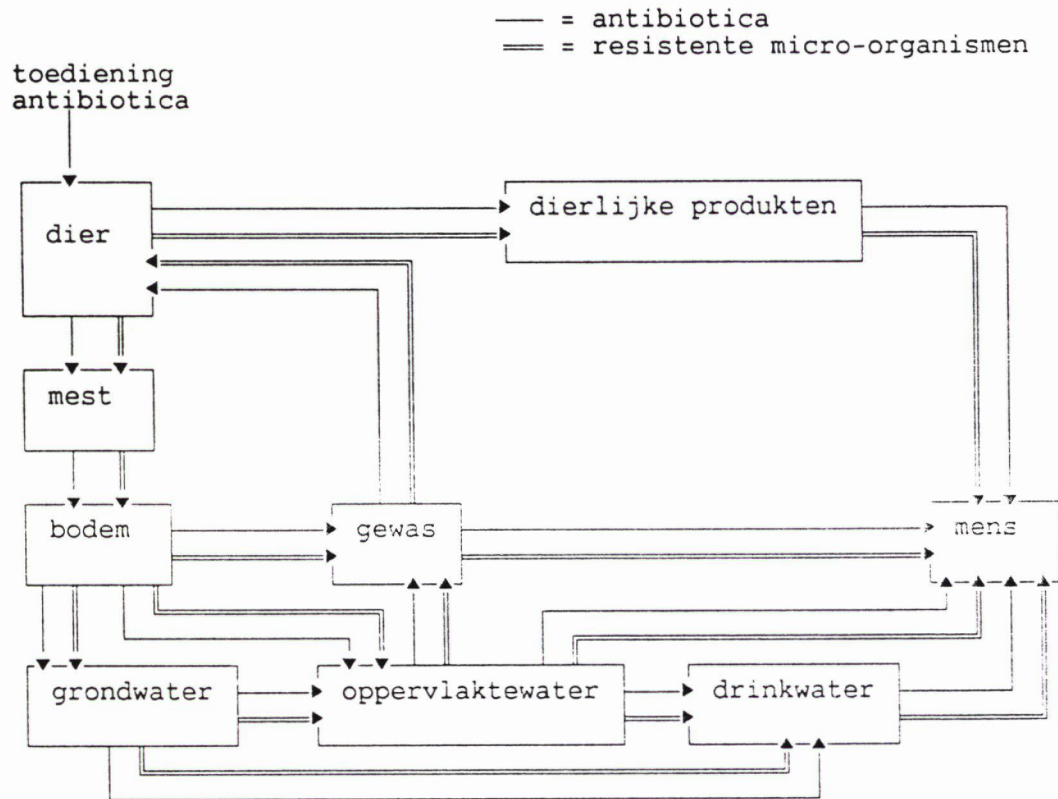
Lebek (1979) pleit ervoor om het gebruik van antibiotica, die resistente plasmiden veroorzaken te vermijden in de veehouderij. Volgens hem zou het het beste zijn als antibiotica gebruikt in medicijnen voor mensen, niet voor dieren zouden worden gebruikt (Lebek, 1979). In Engeland is zelfs het besluit genomen om de toepassing van medisch

gangbare antibiotica in de veehouderij te verbieden (Manten, 1971). In Nederland is in 1989 een ad hoc commissie binnen het RIVM ingesteld om duidelijkheid te krijgen over de ernst van de resistentieproblematiek en de wenselijkheid om middelen voor veterinair gebruik te verbieden. Deze commissie is tot de conclusie gekomen dat veterinair gebruik van een aantal antibiotica geheel verboden zou moeten worden (Van Gool, 1991).

Aan de andere kant is nu bekend dat vaak de toevoeging van één soort antibioticum op den duur resistentie tegen meerdere soorten antibiotica veroorzaakt, om tot nu toe nog onbekende redenen (Levy, 1986; Durand *et al.*, 1987; Linton, 1988; Davies, 1989). Verder kan één bepaalde soort bacterie met antibiotische resistentie op de R-plasmiden deze resistentie overdragen naar andere soorten bacteriën (Levy, 1986; Davies, 1989). Dit pleit eerder voor een, in alle gevallen, terughoudend gebruik van alle soorten antibiotica.

In eerste instantie dient te worden nagegaan hoe het compartiment bodem bijdraagt aan de blootstelling van de mens aan resistente bacteriën. Het gaat hier om resistentie tegen antibiotica in brede zin, dat wil zeggen zowel biologisch geproduceerde (antibiotica in enge zin) als chemisch geproduceerde antimicrobiële middelen (chemotherapeutica).

In figuur 1 zijn de mogelijke wegen aangegeven waarlangs de aan het vee toegediende antibiotica en de resistente bacteriën zich kunnen verspreiden en uiteindelijk de mens bereiken.



Figuur 1 Verspreiding antibiotica en resistentie.

In de hiernavolgende hoofdstukken wordt een eerste overzicht gegeven van de aanwezige kennis van het probleemveld. Hoofdstuk 2 gaat in op het veterinaire gebruik van antibiotica, met name de manieren van toediening en de gebruikte hoeveelheden. In hoofdstuk 3 wordt de verspreiding van deze antibiotica in het milieu behandeld. In hoofdstuk 4 wordt kort aangegeven welke factoren een rol spelen bij het ontstaan en bij de overdracht van bacteriële antibiotische resistentie. In hoofdstuk 5 wordt een eerste indruk gegeven van de bestaande, relevante kennis op het gebied van de verspreiding van bacteriële antibiotische resistentie in het milieu. Tenslotte worden in hoofdstuk 6 de conclusies weergegeven (inclusief aanbevelingen voor verder onderzoek) en worden eventuele gevolgen voor beleidsontwikkeling genoemd.



2. VETERINAIR GEBRUIK ANTIBIOTICA

2.1 VORMEN VAN TOEDIENING ANTIBIOTICA

De antibiotica kunnen op verschillende manieren aan de dieren worden toegediend:

- 1) Als additief in het veevoer;
- 2) Via gemedicineerd voer op voorschrift van de dierenarts;
- 3) Als diergeneesmiddel (niet via gemedicineerd voer) op voorschrift van de dierenarts.

Als additief in het veevoer

Dit gebruik heeft zowel een nutritief (groeibevordering en verbeterde groeiconversie) als een preventief (voorkómen van infecties) doel. Om de paar maanden worden de antibiotica gewisseld om tegen te gaan dat er resistentie ontstaat. In de verordening voor diervoeder (Produktschap voor Veevoer, 1986) is vastgelegd welke stoffen als additief door het voer mogen worden gemengd en in welke concentraties. Deze lijst bevat 9 antibiotica (in enge zin), 22 coccidiostatica en 2 groeibevorderende stoffen.

Via gemedicineerd voer op voorschrift van de dierenarts

Het gebruik hiervan dient meestal een preventief doel: als er een ziekte dreigt of als er enkele dieren ziek zijn en het gevaar van besmetting bestaat. Het kan ook curatief (therapeutisch) worden gebruikt: als er een ziekte onder de dieren is uitgebroken.

In gemedicineerd voer mogen de diergeneesmiddelen die volgens de Diergeneesmiddelenwet zijn toegestaan worden verwerkt. De concentraties worden door de dierenarts bepaald. Gemedicineerd voer kan onderscheiden worden in:

- gemedicineerd standaardvoer: dit wordt bereid volgens vaste recepten en mag door de mengvoederfabrikanten in voorraad worden gehouden. Voor standaardvoer mag alleen gebruik worden gemaakt van de in het Landbouwkwaliteitsbesluit gemedicineerd voeder toegelaten middelen.
- gemedicineerd speciaalvoer: dit wordt na ontvangst van een recept per geval door de fabrikant gemengd. In het speciaalvoer kan elk door de dierenarts voorgeschreven diergeneesmiddel worden verwerkt.

Als diergeneesmiddel op voorschrift van de dierenarts

De toegestane middelen staan in de Diergeneesmiddelenwet. Hierbij zijn twee soorten van toediening te onderscheiden:

- collectieve behandeling, via het drinkwater of als top-dressing (het geneesmiddel wordt in dit geval over het voer gestrooid als het in de voederbakken ligt). Evenals bij gemedicineerd voer is het gebruik hier preventief of curatief;
- in een individuele behandeling; het gaat hierbij om curatief gebruik, in het geval één of enkele dieren ziek zijn. De toediening kan op diverse manieren gebeuren: oraal, via injectie of uitwendig.

De verschillende manieren van toediening komen niet bij alle diersoorten evenveel voor. Toediening van antibiotica via het veevoer vindt vooral bij varkens, slachtpluimvee en ook mestrunderen plaats. Gemedicineerd standaardvoer bestaat ook alleen voor deze groepen. Bij melkkoeien en legkippen is het gebruik van deze middelen via het voer niet gebruikelijk vanwege het gevaar van residuen in de melk en in de eieren.

2.2 HOEVEELHEID TOEGEDIENDE ANTIBIOTICA

Het Instituut voor Landbouwkundig Onderzoek van Biochemische Produkten (ILOB) heeft de gebruikscijfers van de belangrijkste additieven en diergeneesmiddelen voor 1979 geïnventariseerd via schriftelijke en telefonische enquêtes (De Roij & De Vries, 1980). In tabel 1 staan de totalen per categorie middelen.

Tabel 1. Gebruik van enkele categorieën additieven en diergeneesmiddelen in 1979 (bron: De Roij & De Vries, 1980).

Categorie	Gebruik in (1000 kg):			totaal
	als additief	in gemedicineerd voer	diergeneeskundig 2)	
Antibiotica ¹⁾	91,7	6,7	46,9	145,3
Chemotherapeutica	201,8	17,0	7,0	225,9
- coccidiostatica	-	52,5	71,0	123,5
- overige				
Groeibevorderende stoffen	42,3	-	1,0	43,3
Totaal	335,8	76,2	125,9	537,9

¹⁾ antibiotica in enge zin

²⁾ gebruik op voorschrift van dierenarts, exclusief via gemedicineerd voer

De Roij & De Vries signaleren dat het verbod als additief van een aantal middelen nauwelijks invloed heeft gehad op het gebruik. Redenen voor een verbod waren het

beter onder controle houden van het gebruik en het doen afnemen van het gebruik. Dit was naar aanleiding van de verworven kennis over resistentie-ontwikkeling tegen deze middelen bij micro-organismen en over de toxiciteit van de verbindingen. Het verbod heeft echter geen daling van het gebruik teweeggebracht. In sommige gevallen is het zelfs toegenomen. In het algemeen heeft er een verschuiving naar het gemedicineerd voer plaatsgevonden.

Het onderzoek van de ILOB vormt het meest recente uitgebreide cijfermateriaal over hoeveelheden veterinair toegepaste antibiotica, afgezien van de gegevens over gemedicineerd voer. Deze worden bijgehouden door het Produktschap van Veevoeders. De producenten van de antibiotica, de farmaceutische industrie, hebben informatie over hoeveelheden die per middel worden geproduceerd. Door de Vereniging van Fabrikanten en Importeurs van Diergeneesmiddelen in Nederland (FIDIN) wordt een inventarisatie gemaakt van de hoeveelheden antibiotica die in Nederland worden gebruikt. De vraag is of, en zo ja, wanneer deze cijfers beschikbaar zijn.

Hoeveelheden als additief

Het is moeilijk om een indruk te krijgen van de hoeveelheden van de verschillende antibiotica die worden gebruikt als additief. Er zijn veel mengvoederfabrikanten die ieder hun eigen voedersamenstelling op de markt brengen aan de hand van de toegelaten middelen (Oldenkamp, 1991).

Natuur en Milieu (Van Gool, 1991) heeft een schatting gemaakt van de totale hoeveelheid antibiotica die wordt gebruikt als additief. De totale veevoederproductie in Nederland in 1988 bedroeg ongeveer 17 miljoen ton. Naar schatting bevat ongeveer de helft antibiotica. De gemiddelde concentratie antibiotica als additief in veevoer is volgens het Produktschap voor Veevoeders ongeveer 100 mg/kg. Hieruit volgt een geschatte totale hoeveelheid antibiotica als additief van 850 ton/jaar. Ter vergelijking: het ILOB vond voor 1979 een totale hoeveelheid antibiotica als additief van 335 ton/jaar (zie tabel 1). Op grond van deze cijfers zou geconcludeerd kunnen worden dat er sprake is van een stijging van deze categorie in de afgelopen tien jaar.

Hoeveelheden in gemedicineerd voer

Volgens de Verordening gemedicineerd voeder moeten gegevens over de productie van gemedicineerd voer worden gemeld aan het Produktschap van Veevoeders. Deze gegevens moeten daarom bij het Produktschap aanwezig zijn. Tot 1985 werden de

gegevens inderdaad bijgehouden door het Produktschap. Sindsdien is er geen overzicht meer gemaakt. Geschat wordt dat de situatie niet veel is veranderd.

De gegevens van 1984 betreffen 60 bedrijven die 58,5% van de landelijke productie van varkens- en pluimveevoeder voor hun rekening nemen. De productie van gemedicineerd voer door deze bedrijven was 127.000 ton (LAC, 1986) Extrapolatie hiervan leidt tot een schatting van 220.000 ton gemedicineerd voer in 1984.

De gemiddelde concentratie antibiotica in gemedicineerd voer wordt door het Produktschap voor Veevoerders geschat op 400 mg/kg. De totale hoeveelheid toegediende antibiotica via gemedicineerd voer kan hiermee geschat worden op 88 ton/jaar. Dit is iets meer dan door het ILOB in 1979 werd gevonden (zie tabel 1).

Hoeveelheden overig diergeneeskundig

Hoeveel antibiotica er op andere manieren (dus niet als additief of via gemedicineerd voer) worden toegediend, is niet bekend. Door een dierenarts (Oldenkamp, 1991) is op grond van diverse inlichtingen een schatting gemaakt van de hoeveelheden van de belangrijkste groepen aan het vee verstrekte diergeneesmiddelen, exclusief via gemedicineerd voer.

Tabel 2. Schatting van het jaarlijkse gebruik van enkele antibiotica in kg, exclusief via gemedicineerd voer (bron: Oldenkamp, 1991).

Antibioticagroep	Wijze van bediening:			totaal
	parenteraal	oraal	intramammair	
β-lactam verbindingen	23500	-	3500	27000
aminoglycosiden	15500	-	600	16100
tetracyclines	6000	11000	-	17000
sulfonamiden	22000	55000	-	77000
totaal				137100

De totale hoeveelheid voor de vier genoemde groepen komt ongeveer overeen met de totale hoeveelheid die het ILOB voor 1979 heeft gevonden (zie tabel 1).

Zwarte markt

Verder is er een zwart circuit waarin middelen door handelaren rechtstreeks aan de boeren worden verkocht. De schattingen over de omvang hiervan lopen zeer uiteen. De Roij & De Vries (1983) schatten dat dit circuit ongeveer even groot is als het legale gebruik (De Roij & De Vries, 1983). Volgens de inschatting van een dierenarts (Oldenkamp, 1991) daarentegen, vormt de zwarte markt hoogstens enige procenten.

Dit concludeert hij op basis van het feit dat 80% van de varkenshouderij (20% van de bedrijven) wordt begeleid door dierenartsen.

Conclusie

De grootste hoeveelheid antibiotica wordt als additief toegediend. De hoeveelheden die als diergeneesmiddel (via gemedicineerd voer of anderszins) worden toegediend zijn ten opzichte hiervan relatief klein, maar substantieel. Als het om risico's voor het milieu of de volksgezondheid gaat, kan men echter niet zonder meer stellen dat de additieven de belangrijkste groep vormen. Het gaat immers om verschillende middelen met verschillende risico's. Hierbij moet tevens bedacht worden dat een aantal stoffen die een relatief groot risico vertegenwoordigen vanwege persistentie, mobiliteit, toxiciteit of resistentievorming, zijn verboden als additief.

Voor een goede risicobeoordeling zou het beter zijn om de hoeveelheden van een aantal relevante of veel gebruikte middelen of groepen van middelen te schatten gezien de verschillen in gedrag en effecten (zie ook hoofdstuk 3).

3. VERSPREIDING VAN ANTIBIOTICA

3.1 ANTIBIOTICA IN HET DIER

Het gedrag van de toegediende middelen in het dier is afhankelijk van de diersoort, de toedieningswijze (parenteraal, oraal of intramammair), de gezondheid van het dier en de formulering van het middel. Voor een goed zicht op het gedrag van de antibiotica en daarmee op de hoeveelheden die worden uitgescheiden via de mest, is het nodig na te gaan welke middelen aan welke diersoorten op welke wijze worden toegediend (Oldenkamp, 1991).

In het algemeen kunnen de aan het dier toegediende middelen:

- worden afgebroken tot onschadelijke eindprodukten;
- worden gemetaboliseerd, de metabolieten kunnen in de mest terecht komen;
- accumuleren (al of niet als metabool) in weefsels of dierlijke produkten (eieren, melk);
- onveranderd worden uitgescheiden.

Er is relatief veel onderzoek verricht naar het gedrag van antibiotica in dieren. De meeste stoffen accumuleren niet in het dier, maar worden gemetaboliseerd of onveranderd uitgescheiden. In welke mate en in welke verhouding metabolisatie en uitscheiding plaatsvinden, verschilt sterk per middel. De in de literatuur genoemde fracties van ongewijzigde uitscheiding variëren van nihil tot 90%, hetzelfde geldt voor metabolisering (De Roij & De Vries, 1983; LAC, 1986). Naar schatting komt gemiddeld 75% onveranderd in het milieu terecht (Elmund *et al.*, 1971) in (Addison, 1984). Dit is een zeer grove schatting, die wel enigszins ondersteund wordt door onderzoeksresultaten. Van sommige antibiotica is bekend dat ook één of meerdere metabolieten antimicrobiële activiteit vertonen (De Roij & De Vries, 1980; LAC, 1986).

3.2. ANTIBIOTICA IN DIERLIJKE PRODUCTEN

Vanwege het gevaar van residuen in melk en eieren is het gebruik van antibiotica bij melkkoeien en legkippen beperkt. Toch worden ook aan deze groepen vee antibiotica toegediend en de produkten worden in deze gevallen niet altijd van de markt gehouden (bijvoorbeeld melk na behandeling van koeien). Zo kunnen er toch antibiotica in

de melk en de eieren terechtkomen. Voor slachtvee zijn er limieten gesteld. Voor het dier geslacht wordt mogen gedurende een bepaalde tijd (wachttijd) geen middelen meer worden toegediend. Deze wachttijd is gebaseerd op de tijd die het middel nodig heeft om uit het lichaam van het dier te verdwijnen. Indien de wachttijd niet in acht wordt genomen of als de dieren onbedoeld middelen binnenkrijgen kunnen er toch residuen in het vlees terechtkomen.

De blootstellingsroute via dierlijke producten wordt in deze studie niet verder in beschouwing genomen (zie hiervoor o.a. RIVM, 1989).

3.3 ANTIBIOTICA IN DE MEST

Natuur en Milieu (Van Gool, 1991) heeft een ruwe schatting gemaakt van de gemiddelde concentratie antibiotica die in de mest terecht komt. De schatting beperkt zich tot de antibiotica die als additief en via gemedicineerd voer worden toegediend. Verder is bij de berekening gesteld dat de toediening zich concentreert op slachtvee en dat koeien en legkippen normaal gesproken geen antibiotica via het voer krijgen toegediend. Voor de hoeveelheid mest is dan ook alleen de productie van varkens en slachtkippen genomen.

De volgende gegevens en schattingen zijn gebruikt*:

- hoeveelheid toegediende antibiotica per jaar:

als additief	850 ton
in gemedicineerd voer	88 ton
	938 ton
- hoeveelheid mest van slachtkippen en varkens: 20 miljoen ton
- van de opgenomen middelen wordt 75% weer uitgescheiden

Op grond van deze gegevens kan de gemiddelde concentratie in de mest worden geschat op: 35 mg/kg.

Het is waarschijnlijk zinniger om deze hoeveelheid voor een aantal relevante middelen of groepen middelen te schatten, gezien het feit dat er (grote) verschillen zijn in gebruik, metabolisme, gedrag in milieu en effecten.

* de berekening is opnieuw uitgevoerd op basis van een ander cijfer voor de hoeveelheid gemedicineerd voer (zie paragraaf 2.2)

De mest wordt eerst verzameld en opgeslagen in de vorm van mesthopen of in mestkelders. De middelen in de mest kunnen:

- worden afgebroken tot onschadelijke eindprodukten (door biologische en chemische afbraakprocessen);
- worden gemetaboliseerd;
- onveranderd blijven.

Het oorspronkelijke middel en de metabolieten komen bij het uitrijden van de mest op de bodem terecht.

3.4 ANTIBIOTICA IN DE BODEM

Voor het bepalen van de hoeveelheid antibiotica die in de bodem terecht komt via de mest, moet allereerst een schatting gedaan worden van de hoeveelheid uitgereden mest per oppervlakte grond. Dit kan via verschillende wegen:

- 1) Op basis van de totale oppervlakte cultuurgrond (ongeveer 2 miljoen ha), waarbij ervan wordt uitgegaan dat de mest evenredig over het land wordt verdeeld. Natuur en Milieu (Van Gool, 1990) heeft via deze weg een schatting gemaakt. De hoeveelheid varkens- en slachtkippemest (van 20 miljoen ton/jaar) wordt gesteld op 24% van de totale mestproduktie. Aangenomen dat deze op 24% van de cultuurgrond terecht komt, geeft dit als resultaat een hoeveelheid van 4,2 kg mest/m².
- 2) Op basis van bemestingsnormen. In het Besluit gebruik dierlijke meststoffen (Staatsblad, 1987) wordt een voortschrijdende normering gegeven voor de hoeveelheid fosfaat, uitgesplitst naar soort grond (zie tabel 3). De eindnorm voor 2000 is nog niet vastgesteld; in de tabel staan de nu in overweging zijnde normen genoemd.

Tabel 3. Voortschrijdende normering van het gebruik van dierlijke meststoffen in kg fosfaat/ha/jaar (Besluit gebruik dierlijke meststoffen).

Periode	kg fosfaat/ha/jaar op		
	bouwland	snijmaïsland	grasland
1991 - 1995	125	250	200
vanaf 1995	125	+ 175	+ 175
eindnorm (+ 2000)*	70	75	110

* eindnormen zijn in overweging

Voor het fosfaatgehalte in de mest wordt uitgegaan van het gemiddelde in varkens- en slachtkippemest. Hieronder staan voor varkens en slachtkippen de hoeveelheden mest en de fosfaatgehalten weergegeven.

Tabel 4. Mestproductie en fosfaatgehalte voor varkens en slachtkippen, 1988 (bron: CBS, 1989a).

	mestproductie (miljoen ton/jaar)	fosfaatgehalte (g P ₂₀₅ /kg mest)
varkens (dunne mest)	19,2	4,3
slachtkippen (vaste mest)	0,4*	26
varkens + slachtkippen	19,6	4,7

* afgeleid uit aantal slachtkippen (CBS, 1989b) en hoeveelheid mest per dier (CBS, 1989a)

De gemiddelde concentratie fosfaat in de mest van varkens en slachtkippen is 4,7 g/kg. Uitgaande van de maximale fosfaatnorm van 250 kg/ha voor snijmaïsland (varkensmest wordt alleen over bouwland en snijmaïsland uitgereden), kan een hoeveelheid uitgereden mest van 5,3 kg/m² berekend worden. Uitgaande van de in overweging zijnde eindnorm voor snijmaïsland van 75 kg fosfaat/ha, komt de hoeveelheid op 1,6 kg mest/m².

Op basis van deze berekende hoeveelheden uitgereden mest is een schatting gemaakt van de concentraties antibiotica in de bodem na uitrijden. Hierbij is uitgegaan van de hiervoor berekende concentratie in de mest van 35 mg/kg. Dit betekent dat er geen rekening is gehouden met afbraak tijdens de opslag in mesthopen en -kelders en dat de schatting dus te hoog is.

Aangenomen wordt dat de antibiotica zich over de bovenste 10 cm van de bodem verdelen en dat de bodem een soortelijk gewicht heeft van 1,5 kg/dm³. Verder is geen rekening gehouden met afbraak noch met accumulatie in de bodem. De resultaten staan in tabel 5 weergegeven.

Tabel 5. Schatting van concentratie antibiotica (in mg/kg) in de bodem bij verschillende hoeveelheden uitgereden mest (in kg/m²).

Schatting op basis van	hoeveelheid uitgereden mest (kg/m ²)	concentratie antibiotica (mg/kg grond)
oppervlakte cultuurgrond	4,2	1,0
fosfaatnorm: 250 kg/ha	5,3	1,2
75 kg/ha	1,6	0,4

De LAC heeft berekeningen gedaan van de maximale gehalten van een drietal diergeneesmiddelen (oxytetracycline, sulfadimidine en furazolidon) in de bodem na bemesting (LAC, 1986). Hierbij is uitgegaan van de normering van het aantal dierplaatsen per ha op basis van de toenmalige maximale fosfaatnorm (350 kg/ha). Daarna zijn de concentraties in de bodem voor een aantal diersoorten berekend, via de geschatte hoeveelheid toegediend middel per dier (op grond van dosering en therapieduur), aannemende dat 100% van de antibiotica ongewijzigd het dier verlaat en dat de stof zich over een toplaag van 10 cm van de bodem verspreidt. De resultaten variëren van 0,6 tot 5,9 mg/dm³ (LAC, 1986), oftewel 0,4 tot 3,9 mg/kg bij een soortelijk gewicht van 1,5 kg/dm³. Gemiddeld liggen deze hoeveelheden iets hoger dan de bovengenoemde schattingen, hetgeen waarschijnlijk te verklaren is uit de verschillende aannames.

Voor een betere beoordeling van de belasting van de bodem moet met een aantal gegevens rekening houden:

- de intensieve veehouderij en daarmee het verspreidingsgebied van een groot deel van de mest is geconcentreerd in een beperkt deel van Nederland. Het is zeer waarschijnlijk dat de fosfaatnorm in een aantal gebieden wordt overschreden, waarmee ook grotere hoeveelheden antibiotica op de bodem terechtkomen. Hierbij moet worden opgemerkt dat er een steeds grotere toename is van het mesttransport;
- na verspreiding op de bodem worden de antibiotica afgebroken. De snelheid waarmee dit gebeurt, is afhankelijk van de persistentie. Voor de weinig persistente middelen zullen de hiervoor berekende concentraties een overschatting betekenen. Indien eenmaal per jaar mest wordt uitgereden is de gegeven concentratie de maximale beginconcentratie vlak na uitrijden van de mest (waarbij de afbraak tijdens de mestopslag is verwaarloosd). Daarna zal de stof in de bodem afbreken en verdwenen zijn voordat er weer mest wordt uitgereden. Voor persistente stoffen

kan de gegeven concentratie een onderschatting zijn. Dit is het geval als de aanvoer de afbraak overtreft en de stof accumuleert in de bodem;

- mest wordt slechts enkele malen per jaar over het land verspreid, waardoor de belasting in de tijd sterk varieert.

Dit alles betekent dat het belastingsniveau in delen van het land tijdelijk of op den duur (bij accumulatie) zeer hoog kan worden (De Roij & De Vries, 1980).

Ook voor de concentraties in de bodem geldt dat het zinniger is om de hoeveelheden te schatten voor een aantal relevante middelen of groepen van middelen in plaats van voor het totaal aan antibiotica (zie 3 paragraaf 3.2).

De antibiotica in de bodem kunnen:

- worden afgebroken door chemisch of biologische afbraakprocessen tot onschadelijke eindprodukten;
- worden gemetaboliseerd; de metabolieten kunnen dezelfde wegen als de antibiotica volgen;
- zich binden aan bodemdeeltjes, waardoor ze niet beschikbaar zijn voor transport of voor opname door organismen;
- uitspoelen naar het grondwater of afspoelen naar het oppervlaktewater;
- opgenomen worden door planten;
- in beschikbare vorm aanwezig blijven in de bodem en mogelijk effecten veroorzaken bij bodemorganismen en bodemecosystemen verstoren.

Tot nu toe zijn er geen metingen verricht naar antibiotica in het milieu, dus ook niet in de bodem (Van Gool, 1991).

3.5 VERSPREIDING ANTIBIOTICA VANUIT DE BODEM

De in de bodem aanwezige antibiotica kunnen uitspoelen naar het grondwater. De middelen kunnen via het grondwater, door afspoeling van de bodem of via directe lozing van de mest in het oppervlaktewater terechtkomen en daar effecten teweegbrengen op het aquatische ecosysteem. In het grondwater en het oppervlaktewater kunnen de antibiotica een bedreiging vormen voor de drinkwatervoorraden.

Addison (Addison, 1984) heeft, naar analogie van een model voor bestrijdingsmiddelen, een 'Antibiotic Transport and Run-off (ATR) model' ontwikkeld voor het kwantificeren van de verspreiding van antibiotica van landbouwgronden naar het milieu. Antibiotica kunnen in bredere zin worden opgevat als een bestrijdingsmiddel. De modellen lopen voor een groot deel parallel. In submodellen worden de belangrijkste

processen zoals verdamping, afbraak, uitloging, diffusie, adsorptie/desorptie en de hydrologische processen beschreven.

Het model beoogt een hulpmiddel te zijn bij de beheersing van de verspreiding van antibiotica in het milieu. De informatie uit het model, gecombineerd met waarden voor toelaatbare concentraties in het milieu, kunnen de basis vormen voor een regulering van de antibiotica toepassing. Deze kan dan mogelijk gedifferentieerd worden naar bodemkundige, geohydrologische of klimatologische omstandigheden.

De antibiotica kunnen ook vanuit de bodem door de gewassen worden opgenomen. De kringloop is gesloten als dit gras of veevoer betreft en de antibiotica via deze weg weer in het vee terechtkomt (zie figuur 1, hoofdstuk 1).



4. BACTERIËLE ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE

Toediening van antibiotica aan de veestapel en verspreiding hiervan via de mest naar het milieu kan tot gevolg hebben dat er zich bij bacteriën (in het dier, in de mest of in het milieu) resistentie ontwikkelt tegen deze (en andere) antibiotica. De resistentie is vaak gesitueerd op R-plasmiden en daarmee overdraagbaar van de ene op de andere bacteriecel (zie inleiding). Naast de antibiotica kunnen ook de resistente bacteriën zich verspreiden en uiteindelijk de mens bereiken (zie figuur 1, hoofdstuk 1). Hieronder wordt een overzicht gegeven van de aanwezige kennis over de factoren die bepalend zijn voor de mate waarin resistentie-overdracht plaatsvindt en voor de overlevingskansen van resistente bacteriën. Inzicht hierin is noodzakelijk voor een risicobeoordeling.

4.1 ONTSTAAN VAN BACTERIËLE ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE

De dragers van de antibiotische resistentie, de R-plasmiden, waren in de tijd dat antibiotica nog niet werden toegepast, in relatief weinig bacteriën aanwezig (Linton, 1988). Volgens Levy (1984) is het toenemend voorkomen van R-plasmiden in bacteriën in ecosystemen voornamelijk te danken aan het gebruik van antibiotica. Volgens Manten (1971) staan de hoeveelheden antibiotica, die in het milieu van de mens worden toegepast in schril contrast met de uiterst geringe hoeveelheden die doorgaans in de natuur worden aangetroffen. Deze "natuurlijke" antibiotica, afkomstig van bacteriën en schimmels, worden ter plekke zeer snel afgebroken.

Het aanwezig zijn van antibiotica veroorzaakt een zekere selectiedruk onder micro-organismen ten gunste van micro-organismen, die R-plasmiden bevatten. Er bestaan weinig concrete informatie over het verband tussen de vervuiling van het milieu met antibiotica en de selectiedruk die daardoor wordt uitgeoefend (Linton, 1988). Behalve door antibiotica direct, kan tevens een selectiedruk worden uitgeoefend op micro-organismen in het milieu als dat milieu verontreinigd wordt door de antibiotica resistente bacteriën (Linton, 1988).

Samengevat kan bacteriële antibiotische resistentie in een milieu ontstaan, doordat een zekere selectiedruk wordt uitgeoefend door:

- het voorkomen van "natuurlijke" antibiotica;
- vervuiling van het milieu met antibiotica;
- vervuiling van het milieu met antibiotica resistente bacteriën.

Verder is bekend dat het toedienen van kleine hoeveelheden van antibiotica aan mensen en dieren over een langere periode grotere gevolgen voor het milieu kan hebben (door de vorming van antibiotische resistentie) dan wanneer hetzelfde middel in grote hoeveelheden kort wordt gebruikt (Huber, 1971). Lang gebruik van lage concentraties antibiotica geeft een grotere kans op vorming van bacteriële antibiotische resistentie.

In hoeverre overdracht van de resistentie ook in het milieu plaatsvindt, is afhankelijk van de overleving van het micro-organisme en de kans dat het geschikte ontvangercellen tegenkomt. De frequentie waarin dit gebeurt is afhankelijk van het aantal en de constitutie van de donor- en ontvangercellen en van de mobiliteit van de vector waarop het gen zich bevindt (Blom, 1989). Overzichten worden gegeven door Stotzky & Babich (1986), Trevors *et al.* (1987), Levy & Marshall (1988), Stotzky (1989), Saye & Miller (1989), Van Elsas (1991).

Uit experimenten blijkt dat ook micro-organismen die niet van nature in het bodemmilieu voorkomen kunnen overleven en getransporteerd worden. Aangetoond is dat overdracht van genetische informatie mogelijk is.

4.2 FACTOREN DIE DE INSTANDHOUDING VAN ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE BEÏNVLOEDEN

Als antibiotische resistentie in een bepaald milieu eenmaal voorkomt is het interessant na te gaan onder welke voorwaarden deze zich kan handhaven. Dit is van belang voor het inzicht in de overlevingskansen van resistente bacteriën in het milieu.

Het wegvallen van een bepaalde selectiedruk kan tot gevolg hebben dat bijbehorende plasmiden onstabiel worden, gefragmenteerd worden of helemaal verdwijnen (Blom, 1989). Dit kan veroorzaakt worden als de aanwezigheid van een plasmide voor een cel energiebelastend is, waardoor in een niet-selectieve omgeving bacteriën zonder plasmiden in het voordeel zijn (Stotzky & Babich, 1986; Blom, 1989). Het is niet bekend bij welke minimale concentraties van antibiotica (ondergrens) in het milieu in relatie tot de tijd, er sprake is van een niet-selectieve omgeving.

Mensen en dieren die rechtstreeks in contact zijn met antibiotica herbergen bacteriën met de meeste R-plasmiden (Pohl & Thomas, 1979; Renault & Roux, 1972; Siegel *et al.* ,

1975). Ook echter treft men R-plasmiden in bacteriën aan bij personen en dieren, die niet in contact zijn geweest met antibiotica, zelfs in delen van de wereld waar die middelen nog nooit zijn toegepast (Pohl & Thomas, 1979; Huber, 1971; Siegel *et al.*, 1975). De selectiedruk door antibiotica is dus niet de enige factor die men in overweging moet nemen om de persistentie en de verspreiding van R-plasmiden in het milieu te verklaren (Pohl & Thomas, 1979). Als R-plasmiden zich inderdaad kunnen verspreiden bij afwezigheid van antibiotica is het zaak om maatregelen te nemen om de toepassing van antibiotica te minimaliseren (Pohl & Thomas, 1979; Van Gool, 1991).

Overdracht van resistentie in een aquatisch milieu is in verschillende veldonderzoeken aangetoond. Ook hiervoor geldt dat biotische en abiotische factoren van invloed zijn op de overdracht (Blom, 1989). Volgens Linton (1988) vermindert de overdracht van plasmiden bij lage temperaturen (10,6° C t.o.v. 20° C) en onder voedselarme omstandigheden. In alle milieus (ook in de bodem) vindt de overdracht alleen plaats in water. Ook bij lage bodemvochtigheid vindt er minder overdracht van R-plasmiden plaats (Blom, 1989). Mogelijk heeft dit alles te maken met de celdelingsnelheid, welke in het algemeen ook afhankelijk is van de temperatuur en vochtigheid.

Zo ook ontdekten Stotzky & Babich (1986) dat de overlevingskans van bacteriën met R-plasmiden in de bodem over het algemeen beter was in bodems waaraan de kleimineraal montmorilloniet was toegevoegd. Het lijkt aannemelijk dat montmorilloniet de groei en overlevingskans van de donor van het R-plasmide en de ontvangende bacteriën verbetert en zodoende de kans op contact tussen die bacteriën verhoogt. Bij de aanwezigheid van klei en nutriënten is de kans op overleving en overdracht eveneens groter (Van Elsas, 1991).

Geconcludeerd kan worden dat bacteriële antibiotische resistentie bij het wegvallen van een selectiedruk kan verdwijnen, maar ook aangetoond is bij personen en dieren die niet in contact zijn geweest met antibacteriële middelen. Voor de overdracht van bacteriële antibiotische resistentie is de aanwezigheid van water een voorwaarde. Lage temperaturen en voedselarme omstandigheden zijn minder gunstig voor de overdracht van plasmiden. In de bodem stimuleert het kleimineraal montmorilloniet de overdracht. De resistentie overdracht in relatie tot de bacteriële populatiegroei is in genoemde artikelen niet direct onderzocht.

X



5. VERSPREIDING VAN ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE IN HET MILIEU

Zowel de toegediende antibiotica en de daardoor ontstane bacteriële antibiotische resistentie kunnen dezelfde mogelijke verspreidingsroutes, zoals in figuur 1 in hoofdstuk 1 zijn weergegeven voor antibiotica, volgen.

In de hierna volgende paragrafen wordt ingegaan op de verspreiding van de bacteriële antibiotische resistentie volgens de route mest - bodem - water.

5.1 BACTERIËLE ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE IN DE MEST

Er is veel onderzoek gedaan naar de bacteriële antibiotische resistentie in mest door het toevoegen van antibiotica aan veevoeding. Het blijkt dat het gebruik van antibiotica in de veehouderij leidt tot antibiotische resistentie bij micro-organismen van het maag-darmstelsel van dier en mens (Stappen *et al.*, 1989; Marshall *et al.*, 1990). De afdeling bacteriologie van de Gezondheidsdienst van Dieren houdt jaarlijks een overzicht bij van de resistentie-ontwikkeling in dieren. In tabel 6 staat een globaal overzicht van soorten indicator-organismen uit mest, waarbij onderzoek is gedaan naar de antibiotische resistentie.

In mest vormen de *E. Coli*'s de dominante populaties. In een studie naar de overdracht van multi-antibiotische resistentie in opgeslagen kalvermest kon worden aangetoond dat de multi-resistente *Salmonella* deze resistentie overdroeg aan verschillende sero-groepen van *E. Coli*. In het opgeslagen kalverslib nam het aantal levensvatbare Coliformen in de eerste dagen van opslag met enkele orden van grootten af, maar bleef daarna in aantal vrij constant. Dit kon wijzen dat de populatie op peil bleef door constante groei en afsterving of dat deze micro-organismen bij de lagere temperatuur (vergeleken bij de temperatuur in het maagdarm traject van de kalveren) in leven bleven. Het aantal levensvatbare *Salmonella* bleef gedurende de hele onderzoeksperiode van 7 weken constant (Linton, 1988 naar Hinton & Linton, 1982). Dit onderzoek toont aan dat antibiotische resistente bacteriën uit het maagdarm-traject ook na uitscheiding door het vee (via de mest) levensvatbaar blijven en hun resistentie kunnen overdragen.

Tabel 6. Overzicht onderzochte indicator-organismen en hun resistentie tegen bepaalde soorten antibiotica.

Indicator-organisme	Bron	Antibiotische resistentie	Referentie
<i>Clostridium perfringens</i> (in de mest)	V + R	oleandomycine tetracycline favomycine erythromycine spiramycine	Dutta, 1982
<i>Salmonella thyphimurium</i> (in de mest)	R	chloramphenicol	Linton, 1988
	M	sulfamides streptomycine tetracycline	Pohl & Thomas, 1979
<i>Escherichia Coli</i>	R	chloramphenicol	Linton, 1989
	R + V + M	rifampicin multi antib. res.	Marshall et al, 1990
<i>Enterobacteriaceae</i>	R + M	multi antib. res.	Linton, 1988
<i>Shigella</i>	M	sulfamides streptomycine tetracyclines chloramphenicol	Pohl & Thomas, 1979
<i>Bacillus subtilis</i> (in de mest)	V + R + S + K	penicilline dihydrostreptomycine tetracycline tylosin	Huber, 1971

V = varkensmest
R = rundermest
S = schapenmest
K = kippemest
M = menselijke faecaliën

5.2 BACTERIËLE ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE IN DE BODEM

Ten gevolge van het gebruik van antibiotica in de veevoeding treedt dus een verhoogde antibiotica resistentie op bij de bacteriële populaties van mest en via het gebruik van deze dierlijke mest worden verscheidene, al dan niet antibiotica resistente faecale kiemen in het milieu verspreid (Stappen *et al.*, 1989). Er is weinig onderzoek gedaan naar het voorkomen, de verspreiding en de persistentie van bacteriële antibiotische resistentie in de bodem ten gevolge van de bemesting (Linton, 1988; Stotzky & Babich, 1986).

Linton & Hinton hebben een verkennend onderzoek uitgevoerd (Linton, 1988) naar de overleving van antibiotische resistente bacteriën op onbegraasd weideland bemest met kalfs- en varkensslurrie. Monsters van het bovenste gras zonder aarde, en van gras met wortels en aarde werden onderworpen aan bacteriologische tellingen. In beide gevallen werd een scherpe daling gezien van het aantal bacteriën in de eerste zes weken, van meer dan 10^6 tot 10^1 .

In een onderzoek van Stappen *et al.* (1989) werd nagegaan in welke mate intensief gebruik van varkensmest leidt tot het voorkomen van o.m. antibiotica resistente bacteriën in de bodem. Gebruik van mest veroorzaakte een significante verhoging van het aantal oleandomycine - respectievelijk tetracycline - resistente clostridia (indicator micro-organisme uit de mest) in de bodem. Resistentie percentages varieerden van 5,3% respectievelijk 4,6% in onbemeste gronden tot 29,1%, respectievelijk 42,8% in bemeste gronden. Dezelfde tendens werd waargenomen in een overlevingsproef in een lemige zandgrond. Gronden werden bemonsterd over een diepte 0-15 cm (Stappen *et al.*, 1989).

Het aantal faecale coli en faecale streptococci in de bovenste bodemlaag verliep op de verschillende lokaties volgens een eerste orde reactie (zie bijlage 3, figuur 1). Aan de hand van een lineaire regressieanalyse voor de log (CFU)-waarden uitgerekend tijdens de eerste 50 dagen na het tijdstip van bemesting, kon voor de klassieke indicatoren de T90-waarde berekend worden (Chandler *et al.*, 1981). De T90-waarde wordt gedefinieerd als het aantal dagen dat verloopt vooraleer 90% van de aanvankelijk in de bodem gedetecteerde faecale kiemen is afgestorven. Van het aanvankelijk aantal gedetecteerde faecale coli's en faecale streptococci werd, gemiddeld 15 dagen na het bemestingstijdstip, nog slechts 10% gedetecteerd. De afstervings- en migratiecoëfficiënten bedroegen voor de dosissen van 200 en 800 kg mest per hectare respectievelijk 0,063 t.o.v. 0,071 voor de faecale coli's en 0,051 t.o.v. 0,0908 voor de faecale streptococci. Deze waarden waren van dezelfde grootte orde als de afstervingscoëfficiënten, zoals bepaald door Chandler *et al.* (1981), nl. 0,11 en 0,8. Op de zwaar bemeste objecten was een lichte tendens tot snellere afsterving van de faecale kiemen, doch de verschillen waren niet zo uitgesproken als gerapporteerd door Tate (1978). De antibiotica resistente clostridia konden tot 120 dagen na het bemestingstijdstip nog worden gedetecteerd a rato van 10^2 a 10^3 CFU/g grond (zie bijlage 3, figuur 2 en 3) (Stappen *et al.*, 1989). Men kan dus stellen dat bacteriën met antibiotische resistentie nog een geruime tijd in de grond aanwezig blijven nadat "besmette" mest is gebruikt. De bacteriële antibiotische resistentie zou dan ook geruime tijd vanuit deze gronden naar bijvoorbeeld het grondwater en oppervlaktewater kunnen worden verspreid.

Volgens Stappen *et al.* (1989) kan gesteld worden dat het verspreidingspatroon van faecale kiemen in het bodemprofiel in functie van de tijd de resultante is van migratieprocessen enerzijds en microbiële overlevingskinetiek anderzijds. Microbiële verspreiding kan worden toegeschreven aan species-specifieke eigenschappen, zoals bijvoorbeeld de adhesie mogelijkheden van de bacteriën of het overlevingspotentieel.

Zodra de antibiotische resistente bacteriën in het bodemmilieu zijn geïntroduceerd kunnen de genen op de plasmiden, die coderen voor de antibiotische resistentie, overgedragen worden naar de lokale bacteriepopulaties, zodat 'vreemd' DNA in het ecosysteem wordt geïntroduceerd. Hieropvolgend kan de overdracht tussen de lokale organismen gaan plaatsvinden.

In zowel het onderzoek van Stappen *et al.* (1989) en dat van Linton & Hinton (1984) werd gekeken naar de verspreiding en overleving van bacteriën met antibiotische resistentie uit de mest. Een aantal vragen blijven vooralsnog onbeantwoord:

- In hoeverre hebben deze bacteriën uit de mest de typische bodembacteriën beïnvloed door eventuele overdracht van de antibiotische resistentie?
- Wat is de overlevingskans van deze plasmiden in het geheel van het bodem ecosysteem?
- In hoeverre wordt het natuurlijk ecologische evenwicht door deze mestapplicatie (introductie van 'systeemvreemde' plasmiden) verstoord?
- In hoeverre zijn de resistente bacteriën in het voordeel, door bijvoorbeeld resistentie tegen antibiotica uitgescheiden door natuurlijke bodemschimmels?
- Bij welke methode van mesttoediening zou het natuurlijk evenwicht niet verstoord worden en de risico's van verspreiding van de bacteriële antibiotische resistentie kunnen worden geminimaliseerd?

5.3 VERSPREIDING VAN DE BACTERIËLE ANTIBIOTISCHE RESISTENTIE VANUIT DE BODEM NAAR HET GRONDWATER EN/OF OPPERVLAKTEWATER

Bij de verspreiding van de bacteriële antibiotische resistentie vanuit de bodem naar het grondwater en/of oppervlaktewater kunnen aan de hand van figuur 1 (zie hoofdstuk 1) drie mogelijkheden worden onderscheiden:

1. via de grond naar het oppervlaktewater;
2. uitspoelen naar grondwater;
3. via grondwater naar oppervlaktewater.

Volgens de WHO (1978) kunnen afvalwater en oppervlaktewateren een bijdrage leveren aan de verspreiding en circulatie van resistentie. Water is een natuurlijk medium waarin, zoals al eerder in deze studie is gesteld, R-plasmide overdracht onder bepaalde fysische, chemische en biologische omstandigheden kan plaatsvinden. Deze wateren kunnen resistente bacteriën van menselijk en dierlijk afval bevatten (WHO, 1978; Linton, 1988). Water kan als een bron van alle soorten van plasmiden worden beschouwd, die circuleren en die zich selekteren onder geschikte milieu condities. Deze resistente bacteriën kunnen onder bepaalde omstandigheden het voedsel en drinkwater besmetten wat de kringloop naar dier en mens weer sluit.

Het meeste onderzoek tot nu toe, verricht naar de aanwezigheid van antibiotische resistente bacteriën in een aquatische omgeving, had betrekking op bacteriën van menselijke faecale oorsprong (Linton, 1988; Stotzky & Babich, 1986).

In een onderzoek van Stappen *et al.* (1989) naar antibiotische resistente bacteriën in met varkensslurrie bemeste velden, werd in 41,7%, respectievelijk 59,7% van de onderzochte gevallen oleandomycine- en tetracycline-resistente clostridia aangetroffen in het grondwater onder deze velden. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het wel degelijk mogelijk is dat faecale resistente bacteriën van dierlijke oorsprong zich naar het grondwater verspreiden.

Volgens Linton (1988) kan het voorkomen van antibiotische resistentie in een bepaalde groep of soort weinig informatie geven over de relatieve grootte van de genenpoel in een bepaald milieu. Als de totale voorraad van genen moet worden gemeten met voldoende nauwkeurigheid, dan moeten ook bacteriën van een andere dan faecale oorsprong worden beschouwd (Linton, 1988; Stotzky & Babich, 1986).

Met betrekking tot de verspreiding van de resistentie naar het water blijven dezelfde vragen onbeantwoord als in de vorige paragraaf. Maar er doet zich ook een nieuwe vraag voor:

- In hoeverre vindt overdracht van de antibiotische resistentie plaats van 'typische' bodembacteriën (merendeels hydrofoob) naar 'typische' waterbacteriën (merendeels hydrofiel)?



6. DISCUSSIE

Antibiotica worden in grote hoeveelheden aan het vee toegediend. Ruw geschat gaat het om een totaal van ruim duizend ton per jaar, waarvan het grootste deel als additief in het veevoer zit. Precieze cijfers zijn niet voorhanden, noch van de totale hoeveelheden gebruikte antibiotica, noch van de specifieke middelen. Een betere inschatting van de risico's zou mogelijk zijn, indien deze cijfers beschikbaar zouden zijn.

De concentratie antibiotica in de bodem is afhankelijk van het gedrag van de middelen vanaf toediening aan het dier tot en met het verblijf in de bodem. Het gedrag van antibiotica in dieren is redelijk onderzocht, over het gedrag in de mest en in het milieu is weinig bekend. Duidelijk is wel dat de middelen waar onderzoek naar verricht is, wat betreft persistentie, metabolisering en mobiliteit onderling veel verschillen.

In deze studie zijn enkele schattingen gegeven van concentraties in de bodem. Deze liggen in de orde van één tot enkele milligrammen per kg grond. Een schatting van de jaarlijkse hoeveelheid ongewijzigd uitgescheiden antibiotica via de mest is hierbij als uitgangspunt genomen, zonder rekening te houden met afbraak, metabolisering of accumulatie. Voor de persistente stoffen die accumuleren in de bodem zal dit een onderschatting zijn; voor weinig persistente stoffen een overschatting. De belasting zal bovendien per regio en locatie verschillen en ook in de tijd variëren.

Voor een betere beoordeling van milieurisico's is het zinnig om voor veel gebruikte middelen of voor middelen met bekende toxische of resistentie-inducerende eigenschappen (verder) onderzoek te doen naar hoeveelheden en gedrag in het milieu.

De uitgevoerde onderzoeken in de bestudeerde literatuur geven informatie over deelaspecten van resistentie overdracht. De meeste literatuur met betrekking tot antibiotische resistentie overdracht gaat over faecale bacteriën. Onderzochte factoren in relatie tot resistentie overdracht zijn onder meer de temperatuur, vochtigheid, voedselrijkdom en het kleigehalte. Er zijn geen gegevens in de beschouwde literatuur over de overdrachtskinetiek in relatie tot de groeikinetiek van de bacteriepopulatie. Ook is geen inzicht gegeven voor het al dan niet verdringing van populaties zonder R-plasmiden door bacteriën met R-plasmiden (concurrentie in het veld). Er zijn aanwijzingen voor het voorkomen van multi-resistentie bij bacteriën alsook de mogelijkheid tot overdracht van resistentie tussen verschillende soorten bacteriën. Een kwantificering

hiervan in het veld ontbreekt. Derhalve is een afweging van de ernst van antibiotische resistentie overdracht via de verschillende blootstellingsroutes voor mens en milieu niet mogelijk. Wel is duidelijk dat antibiotische resistentie overdracht voorkomt en verspreid kan worden naar de bodem en het grondwater (en zeer waarschijnlijk dan ook naar de mens) en dat deze voor langere tijd persistent is.

Concluderend kan gesteld worden dat het toedienen van grote hoeveelheden antibiotica aan vee, die zich via de mest in het milieu kunnen verspreiden, een mogelijk risico vormt vanwege het gevaar van resistentievorming en -overdracht en de uiteindelijke blootstelling van de mens aan persistente bacteriën. Het is op dit moment vanwege het gebrek aan gegevens niet mogelijk dit risico te kwantificeren. Het zou kunnen dat het om een klein of verwaarloosbaar risico gaat in vergelijking met het risico van resistentie door humaan gebruik van antibiotica, en mogelijk ook in vergelijking met het risico van blootstelling aan resistentie door de consumptie van dierlijke producten. Als men het risico echter in het kader van het streven naar een goede bodemkwaliteit beschouwt, kan men waarschijnlijk niet meer spreken van een zodanig verwaarloosbaar risico dat nader onderzoek achterwege kan blijven.

Voor een verdere aanpak van de antibiotica in de bodem zijn verschillende kaders mogelijk:

1. inpassen in het beleid met betrekking tot milieugevaarlijke stoffen;
2. inpassen in of analoog aan het bestrijdingsmiddelenbeleid;
3. inpassen in het mestbeleid.

Ad 1

Antibiotica kunnen worden beschouwd als milieubelastende stoffen, die risico's voor mens en milieu met zich mee kunnen brengen. Voor deze stoffen geldt de milieudoelstelling de risico's tot een aanvaardbaar en zo mogelijk verwaarloosbaar niveau te reduceren. Naast de aanpak van prioritaire stoffen is er beleid geformuleerd voor de overige stoffen. Doelstellingen zijn humane en ecologische risico's van deze stoffen te beoordelen en de volumes te verminderen. Voor de doelgroep landbouw is de volgende (mogelijk relevante) doelstelling geformuleerd: 'Zware metalen en andere voor het milieu ongewenste stoffen in veevoer worden tot voor het dier fysiologisch minimaal noodzakelijke niveaus teruggedrongen'.

Ad 2

Binnen het beleid voor milieugevaarlijke stoffen is voor bestrijdingsmiddelen apart beleid ontwikkeld.

Antibiotica zijn in brede zin op te vatten als bestrijdingsmiddelen. Ze dienen ter voorkoming van ziekteverwekkende organismen en werken daarmee produktieverhogend. Analoog aan het bestrijdingsmiddelenbeleid (Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, 1989) zou het gebruik van antibiotica zodanig moeten worden aangepast, dat onaanvaardbare risico's voor het milieu worden voorkomen. De antibiotica moeten onderzocht en beoordeeld worden op milieu-effecten. Door aanpassingen in de bedrijfsvoering kunnen de toegediende hoeveelheden worden verminderd. De producent zal bij nieuwe produkten onderzoek moeten doen naar milieu-effecten en voor oude middelen alternatieven moeten zoeken voor die stoffen die accumuleren in het milieu, sterfte veroorzaken aan andere dan de te bestrijden organismen of uitspoelen naar het grondwater.

Ad 3

In het kader van het mestbeleid (VROM, 1989) kunnen naast de vermestende stoffen ook de additieven, inclusief de antibiotica in gemedicineerd voer, worden aangepakt. Hiervoor zijn verschillende ingangen denkbaar. Verdere eisen kunnen worden gesteld aan de samenstelling van de mest (die door de mestbank wordt gedistribueerd). Voorwaarden kunnen worden gesteld aan het uitrijden van mest. Een andere ingang is het veevoer. Ook hier kan worden aangesloten bij het beleid dat alle voor het milieu ongewenste stoffen die aan het dier worden toegediend, moeten worden teruggedrongen tot fysiologisch minimaal noodzakelijke niveaus.

Tevens kan worden opgemerkt dat er relaties zijn met het beleid ten aanzien van genetisch gemanipuleerde micro-organismen. Er zou, door ongecontroleerde verspreiding van antibiotica en daarmee samenhangende resistentiefactoren sprake kunnen zijn van een ongecontroleerd genetisch manipulatie experiment in situ, waarvan de lange termijn gevolgen niet goed zijn in te schatten. Vooral het specifieke probleem van de resistentievorming en -overdracht pleit voor een eigen benadering. Het gaat immers niet alleen om directe toxiciteit en afbreekbaarheid, zoals bij milieugevaarlijke stoffen en bestrijdingsmiddelen. Ook in eerdere studies werd opgemerkt dat kennis over het gedrag van genetisch gemodificeerde organismen in het milieu ontbreekt (onder meer De Roij & De Vries, 1980; Van Loosdrecht & Pijnenborg, 1987; Davies, 1991). Onderzoek in het veld is nodig naar het gedrag van in het milieu geïntroduceerd genetisch materiaal.

In ieder geval zal voor een goede beoordeling van de risico's verder onderzoek moeten worden verricht naar hoeveelheden en gedrag van antibiotica in het milieu en naar de factoren die een rol spelen bij de resistentievorming en -overdracht en de

overleving van resistente bacteriën in het milieu. Voor de efficiëntie en voor een goede afstemming zou een onderzoekprogramma moeten worden opgesteld.

7. LITERATUUR

- Addison, J.B., 1984. 'Antibiotics in sediments and run-off waters from feedlots'. Residue Reviews vol.92.
- Blom, A.J.M., 1989. 'Literatuurstudie naar de overdracht van genetische informatie bij bacteriën in het milieu'. MT-TNO, Delft.
- CBS, 1989a. 'Productie van dierlijke mest, 1988' in Kwartaalbericht milieu (CBS) 1989/4, p 29-32.
- CBS, 1989b. 'Landbouwtelling 1989'. CBS, Voorburg.
- Davies, J., 1989. 'Engineering Organisms for Use'. In Conf. Regem (Cardiff), p 21-28.
- Dutta, G.N., 1982. 'In vitro activity of some growth promoting and other antimicrobial agents on selected gram positive bacteria from the caeca of pigs, cattle and poultry'. Doctoraalthesis, Faculteit van de Diergeneeskunde, RUG, België.
- Elmund, G.K. e.a., 1971. 'Role of excreted chlortetracycline in modifying the decomposition process in feedlot waste' in Bull. Environ. Contam. Toxicol. 6, 129.
- Elsas, J.D. van, 1991. 'Antibiotic resistance gene transfer in the environment; an overview' in 'Genetic interactions between microorganisms in natural environments' (eds.: E.H.M. Wellington & J.D. van Elsas), Manchester Univ. Press.
- Gool, S. van, 1991. 'Diergeneesmiddelen, wie wordt er eigenlijk beter van?'. Natuur en Milieu, Utrecht.
- Gowland, P.C. & J.H. Slater, 1984. 'Transfer and stability of drug resistance plasmids in Escherichia coli K12' in Microbiol. Ecol.,10,1.
- Hinton, M.; A. Kaukas & A.H. Linton, 1986. 'The ecology of drug resistance in enteric bacteria'. Journal of applied bacteriology Symposium Supplement, p 775-925.
- Huber, W.G., 1971. 'Antibacterial drugs as environmental contaminants. Advances in Environmental Science and Technology', Vol. 2, vii + 354p (eds. Pitts, J.N & Metcalf, R.L.), Wiley-Interscience, London, England, p 289-320.
- Kerk, P. van de, 1982. 'Varkensvoeding in de praktijk'. Groene reeks.
- Landbouwadviescommissie (LAC) Milieukritische Stoffen, 1986. 'Milieurisico's van diergeneesmiddelen'. Ministerie van L&V, Den Haag.
- Levy, S.B., 1987. 'Environmental dissemination of microbes and plasmids'. Swiss Biotech 5, Nr. 2a, p 32-37.
- Levy, S.B. & B.M. Marshall, 1988. 'Genetic transfer in the natural environment' in 'The release of genetically-engineered microorganisms' eds M. Sussman e.a., pp 61-76. Academic Press, London.
- Linton, A.H., 1988. 'Plasmids in the environment'. Schriftenr Ver Wasser Boden Lufthyg, 78 197-224, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, West Germany.

- Linton, A.H.; A.T. Hedges & P.M. Benett, 1988. 'Monitoring for the development of antimicrobial resistance during the use of olaquinox as a feed additive on commercial pig farms'. *Journal of applied bacteriology*. 64, p 311-324.
- Loosdrecht, M.C.M. van & J.W.M. Pijnenborg, 1987. 'Genetisch gemodificeerde (micro)-organismen: op weg naar een verantwoorde toepassing in het milieu'. Verslag van een workshop. Speerpuntprogramma Bodemonderzoek. Wageningen. 18 p.
- Marshall, B.; D. Petrowski, & S.B. Levy, 1990. 'Interspecies and intraspecies spread of Escherichia Coli in a farm environment in the absence of antibiotic usage. Proc. Natl. Acad. Sci., 87 (17), 6609-6613, USA.
- Mercer, H.D.; D. Pocurull; S. Gaines; S. Wilson & J.V. Benett, 1971. 'Characteristics of antimicrobial resistance of Escherichia coli from animals: relationship to veterinary and management uses of antimicrobial agents'. *Applied microbiology* 22(4), p 700-705.
- Miert, A.S.J.P.A.M. van, 1979. 'Veevoederadditieven, nu en in de toekomst, beoordeling voor de toelating' in Symposium syllabus Veevoederadditieven, nu en in de toekomst. Nefato, Utrecht.
- Ministerie van VROM, 1989. 'Nationaal Milieubeleidsplan. Kiezen of verliezen', Tweede Kamer, vergaderjaar 1988-1989, 21137, nrs 1-2.
- Oldenkamp, E.P., 1991. 'Het gebruik van antibiotica bij dieren'.
- Oosterom, J., 1986. 'Bacteriële kringlopen' in *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* deel 111, afl.10, pp 467-470.
- Pohl,P; J. Thomas, 1979. 'Les reservoirs de plasmides et leur circulation'. *Annales de Medicine Veterinaires*; 123(6), 385-396.
- Produktschap voor Veevoer, 1991. 'Verordening Diervoeder 1986', in 'Diervoederwetgeving in Nederland, deel 1'. Den Haag.
- RIVM, 1989. 'Advies inzake inperking van het arsenaal van antimicrobiële geneesmiddelen voor veterinaire toepassing'. Aanbevelingen van een ad hoc Werkgroep'. RIVM Bilthoven.
- Roij, Th.A.J.M. de, & P.H.U. de Vries, 1980. 'Milieutoxicologische aspecten van het gebruik van veevoederadditieven en therapeutica. Persistentie in dierlijke excreta en milieu'. Reeks Bodembescherming nr.4. Ministerie van Volksgezondheid en Milieuhygiëne, Den Haag.
- Roij, Th.A.J.M. de, & P.H.U. de Vries, 1983. 'Veevoederadditieven, diergeneesmiddelen en het milieu' in *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* deel 108 afl. 17 pp 665-671.
- Saye, D.J. & R.V. Miller, 1989. 'The aquatic environment consideration of horizontal gene transmission in a diversified habitat, in 'Gene transfer in the environment', eds. S.B. Levy en R.V. Miller, pp 223-260. McGraw-Hill, New York.
- Spika, J.S.; S.H. Waterman; G.W. Soo Hoo; M.E. St. Louis; R.E. Pacer; S.M. James; M.L. Bisset; L.W. Mayer & J.Y. Chiu, 1987. 'Chloramphenicol-resitant Salmonella Newport traced through hamburger to dairy farms'. *The New England journal of medicine*. 316 (10), p 565-570.

- Stappen, R. van; F. Huysman & W. Verstraete, 1989. 'Microbiële indicatoren van varkensmestapplicatie in landbouwgronden'. *Revue de L'Agriculture - Landbouwtijdschrift, Belgie*. Vol. 42 nr. 5, p1087-1099.
- Staatsblad, 1987. 'Besluit gebruik dierlijke meststoffen'.
- Stotzky, G., 1989. 'Gene transfer among bacteria in soil' in 'Gene transfer in the environment, eds. S.B. Levy en R.V. Miller. pp 165-222. McGraw-Hill, New York.
- Stotzky, G. & H. Babich, 1986. 'Survival of, and genetic transfer by, genetically engineered bacteria in natural environments' in *Advances in Applied Microbiology*, 31, pp 93-138.
- Trevors, J.T., T. Barkay & A.W. Bourquin, 1987. 'Gene transfer among bacteria in soil and aquatic environments: a review' in *Canadian Journal of Microbiology*, 33, pp 191-198.
- World Health Organization, 1978. 'Surveillance for the prevention and control of health hazards due to antibiotic resistant enterobacteria'. *Technical Report Series No. 624.*, 54 pp, Geneva, Switzerland.



BIJLAGE 1 ACHTERGRONDLITERATUUR

- Altreuther, P. 'Entwicklung und Zulassungsverfahren von Zusatzstoffen'. *Kraftfutter* 5/84, 158-162.
- Anoniem. 'Ban complicates pig production'. *Feed International* (May 1988).
- Anonymus, 1977. 'Effect of antibiotic supplementation of animal feed on human intestinal flora'. *Nutr. Rev., USA*, Vol. 35 No.4, p 70-72.
- Behm, G. 'Nachdenkliches über Zusatzstoffe'. *Kraftfutter* 4/84, 112-113.
- Bouma J.E. & R.E. Lenski. 'Evolution of a bacteria/plasmid association'. *Nature* Vol. 335, (22 Sept. 1988), 351-352.
- Compeau, G. e.a. 'Survival of Rifampin - Resistant Mutants of *Pseudomonas fluorescens* Applied and Environmental and *Pseudomonas putida* in Soil Systems'. *Microbiology* Vol.54 No.10 (1988), 2432-2438.
- Devanas, M.A. & G. Stotzky. 'Fate in Soil of a Recombinant Plasmid Carrying a *Drosophila* Gene'. *Current Microbiology*, Vol.13 (1986), 279-283.
- Devanas, M.A. e.a. 'Survival of Plasmid-containing Strains of *Escherichia coli* in Soil: Effect of Plasmid Size and Nutrients on Survival of Hosts and Maintenance of Plasmids'. *Current Microbiology* Vol.13 (1986), 269-277.
- Devanas, M.A. & G. Stotzky. 'Survival of genetically engineered microbes in the environment: effect of host/vector relationship'. *Developments in Industrial Microbiology* Vol.29 (1988), 287-295.
- DuPont, H.L. & J.H. Steele, 1987. 'The human health implication of the use of antimicrobial agents in animal feeds'. *The Veterinary Quarterly*, 9(4) 309-20.
- Durand, A.M.; M.L. Barnard; M.L. Swanepoel & C.M.M. Engelbrecht, 1978. 'Resistance to various antibiotics of *Salmonella* and *Escherichia Coli* isolated from regitral farm feeds'. *Onderstepoort J. Vet. Res.*, 54(1) 21-26.
- Elsas, J.D. van e.a. 'Transfer of plasmid pFT30 between bacilli in soil as influenced by bacterial population dynamics and soil conditions. *Soil Biol. Biochem.* Vol.19, No.5 (1987), 639-647.
- Finlayson, M. & D.A. Barnum, 1973. 'The effect of chlortetracycline feed additive on experimental *Salmonella* infection of swine and antibiotic resistance transfer'. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 37; No. 2; 139-146.
- Fuller, R. 'Agriculture group symposium recent developments in animal feed additives'. *J.Sci.FoodAgric.*45 (1988), 223-230.
- Graham, T.L. 'Genetic engineering of soil microorganisms for pest control'. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 24 (1988), 317-323.
- Graham T.L. 'Gene exchange and natural selection cause *Bacillus subtilis* to evolve in soil culture'. *Science*, Vol.204 (11 May 1979), 637-639.

- Henschke, R.B. & F.R.J. Schmidt. 'Screening of soil bacteria for plasmids carrying antibiotic resistance'. *Biology and Fertility of Soils* 9 (1990), 257-260.
- Jager, L.P. e.a. 'Chronische furazolidon vergiftiging van biggen?' *Tijdschr. Diergeneeskd.* deel 109, afl. 22 (1984), 922-927.
- Kelch, W.J. & J.S. Lee. 'Antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria isolated from environmental sources'. *Applied and Environmental Microbiology* Vol.36 No.3 (1978), 450-456.
- Kelly, W.J. & D.C. Reaney. 'Mercury resistance among soil bacteria: ecology and transferability of genes encoding resistance'. *Soil Biol. Biochem.* Vol.16, No.1 (1984), 1-8.
- Kelly, W.R., 1978. 'Animal and human health hazards associated with the utilization of animal effluent'. Publication Commission of the European EUR 6009; xii + 328 pp; Luxembourg.
- Krasovsky, V.N. & G. Stotzky. 'Conjugation and genetic recombination in *Escherichia coli* in sterile and nonsterile soil'. *Soil Biol. Biochem.* Vol.19, No.5 (1987), 631-638.
- Lacey, R.W. 'Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* and streptococci'. *British Medical Bulletin* Vol.40, No.1 (1984), 77-83.
- Lebek, G., 1979. 'Nutritive antibiotic additives in animal feeding stuff a further form of environmental pollution'. *Zentralbl. Bakteriologie Hyg., Erste Abt. Orig. B.*, 168(5-6), p.562-567, Bern, Switzerland.
- Levin, S.A. 'An ecological perspective on the introduction of genetically engineered organisms into the environment'. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 43 (1988), 257-263.
- Levy, S.B. 'Environmental dissemination of microbes and their plasmids'. *Swiss Biotech* 5 (1987), 32-37.
- Madson, M. e.a. 'Treating cattle with ivermectin: effects on the fauna and decomposition of dung pats'. *Journal of Applied Ecology*. 27 (1990), 1-15.
- Manten, A., 1971. 'De betekenis van antibiotica in het milieu'. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 115(44) 1844-8.
- Miert, A.S.J.P.A.M. van. 'Enkele kanttekeningen bij de toelating respectievelijk de toepassing van diergeneesmiddelen en veevoederadditieven'. *Tijdschr. Diergeneesk.*, deel 108, afl. 17 (1983), 653-659.
- Nefato. 'Symposium syllabus veevoederadditieven, nu en in de toekomst'. Utrecht, 1979.
- Pancorbo, O.C. e.a.. 'Poliovirus retention in soil columns after application of chemical- and polyelectrolyte-conditioned dewatered sludges'. *Applied and Environmental Microbiology* Vol.54, No.1, (1988), 118-123.
- Pemberton, J. M. & R.H. Don, 1981. 'Bacterial plasmids of agricultural and environmental importance'. *Agric. Environ.*, 6(1), 23-32, Australia.
- Renault, L. & L. Roux, 1972. 'Resistance aux agents antibactériens des *Escherichia coli* de la flore intestinale de volailles recevant ou non des antibiotiques a dose

- nutritive dans leur alimentation'. *Receuil de Medicine Veterinaire*, 148; No. 9; 1035-1044, France.
- Salentijn, E. & W.P.M. Hoekstra. 'Overleving en verspreiding van recombinant micro-organismen in de bodem (verslag DGM-project)'. *WMB* 21/5 (Sept. 1988), 1-14.
- Schaftenaar, W. e.a. 'Oxytetracycline en orale koppelbehandeling; een literatuuroverzicht'. *Tijdschr. Diergeneeskd.* deel 115, afl. 18 (1990), 825-836.
- Siegel, D.; W.G. Huber & S. Drysdale, 1975. 'Human therapeutic and agricultural uses of antibacterial drugs and resistance of the enteric flora of humans'. *Antimicrob Agents Chemoter*, 8(5) 538-43.
- Sorber, C.A. & B.E. Moore. 'Survival and transport of pathogens in sludge-amended soil: a critical literature review'. *EPA/600/S2-87/028* (June 1987).
- Takafuji, E.T., 1977. 'The effect of antibiotic drug resistance on the environment and the effect on public health'. *Prev Med*, 6(2) 312-8, Division of preventive medicine, Walter Reed Army Institute of Research, Washington DC.
- Tiedje, J.M. e.a. 'The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations'. *Ecology*, Vol.70, No.2, 298-315.
- Trevors, J.T. 'R-Plasmid transfer in soil'. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39 (1987), 74-77.
- Trevors, J.T. e.a. 'R-Plasmid transfer in non-sterile agricultural soil'. *System. Appl. Microbiol.* 9 (1987), 312-315.
- Weinberg, S.R. & G. Stotzky. 'Conjugation and genetic recombination of *Escherichia Coli* in soil'. *Soil Biol. Biochem.* Vol.4 (1972), 171-180.
- Weller, D.M. & L.S. Thomashow. 'Antibiotics: evidence for their production and sites'. *New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases where they are produced*, Alan R. Liss, Inc, 1990, 703-711.
- Wellington, E.M.H. e.a. 'Growth and survival of streptomycete inoculants and extent of plasmid transfer in sterile and nonsterile soil'. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol.56, No.5 (1990), 1413-1419.
- Wimpenny, J.W.T. 'CRC Handbook of laboratory model systems for microbial ecosystems'. CRC Press, Inc., Florida.

BIJLAGE 2 GERAADPLEEGDE INSTANTIES (PERSONEN)

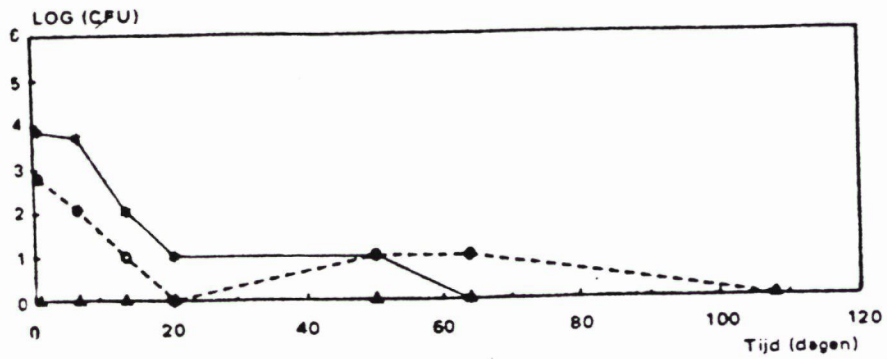
- Bureau Registratie Diergeneesmiddelen
- Centrum voor Landbouw en Milieus (drs.ing. W.H.M.M. van Laarhoven)
- Diergeneeskunde Faculteit, Universiteit Utrecht
(drs. D.J. Mevius, H.D. Stegeman)
- Dierenartsen (enkele)
- Firma Brocacef te Maarsen
- Gezondheidsdienst van Dieren te Roosendaal; afdeling Bacteriologie
- Hoofdproduktschap Akkerbouw
- Instituut voor Bodemvruchtbaarheid (dr. J.D. Elsas)
- IKC-Varkenshouderij
- IKC-Pluimveehouderij
- Landbouwuniversiteit Wageningen, Vakgroep Microbiologie
(dr. A.D.L. Akkermans)
- Landbouwschap
- Mengvoederproducten: - Cehavé
- Hendrix Boxmeer
- Mestbank
- Natuur en Milieu (drs. S. van Gool)
- Produktschap voor Vee en Vlees
- Produktschap voor Pluimvee
- Produktschap voor Veevoer
- Rijksdienst Keuringen
- TNO-MT (dr. J.W. Vonk, A.J.M. Blom)
- Vereniging van Fabrikanten en Importeurs van Diergeneesmiddelen in Nederland
(FIDIN)
- Veterinaire Dienst
- Veterinaire Hoofdinspectie

Handwritten mark or signature in the top right corner.

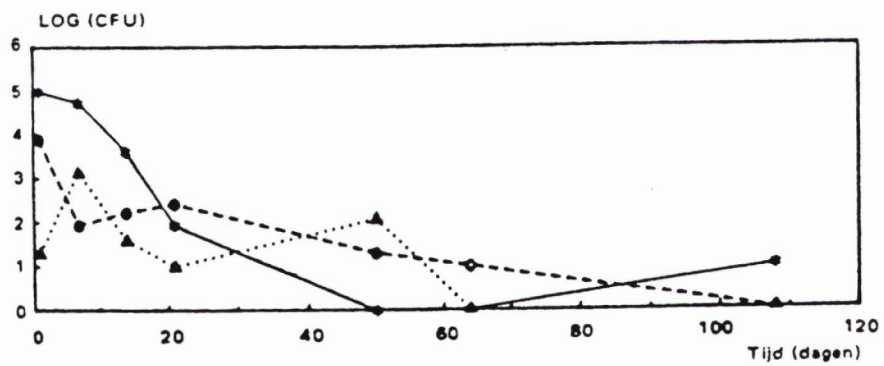


BIJLAGE 3 FIGUREN 1 T/M3

a) 200 ton mengmest/ha



b) 800 ton mengmest/ha

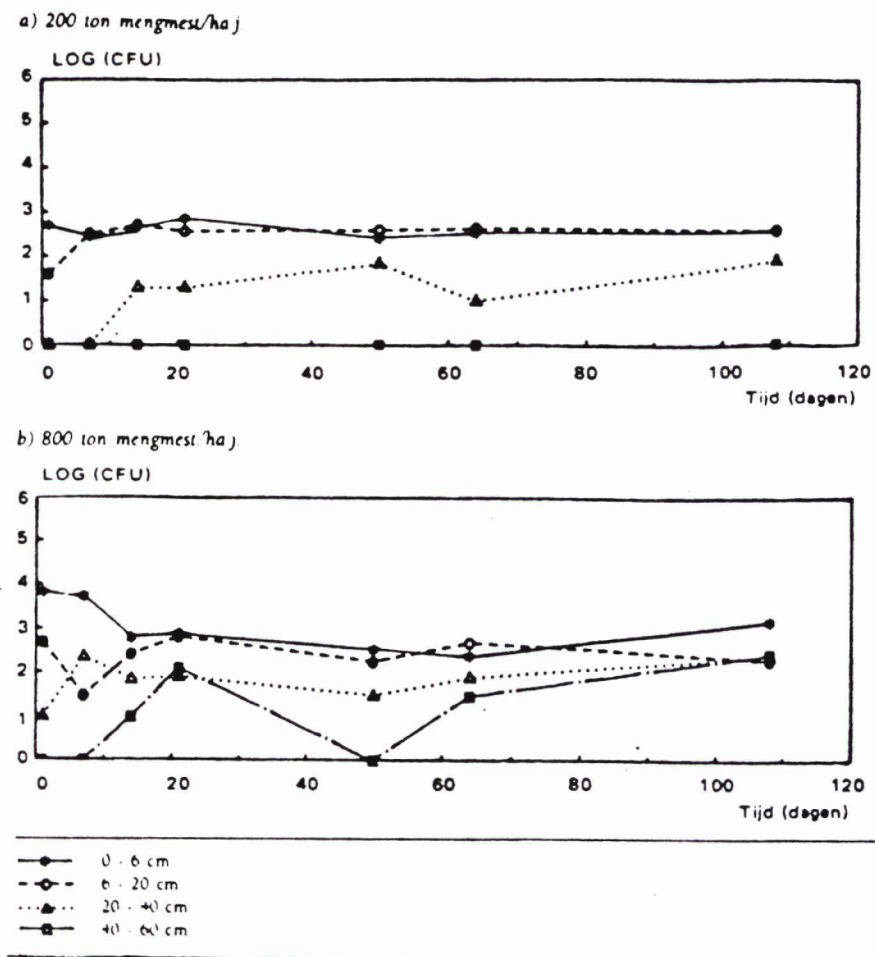


—●— 0 - 6 cm
 -◇- 6 - 20 cm
 ...▲... 20 - 40 cm

Figuur 1. Overleving van faecale streptococcen (Stappen *et al.*, 1989).

A

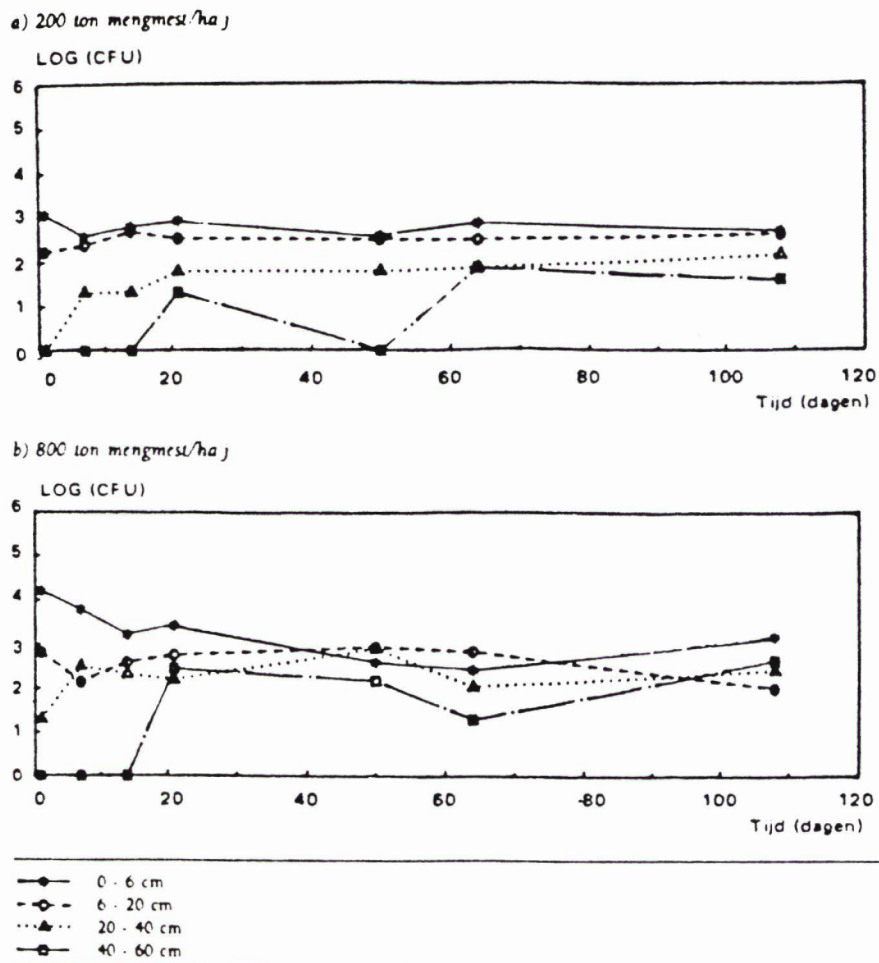




Figuur 2. Overleving en migratie van oleandomycine resistente *Clostridium perfringens* (Stappen *et al.*, 1989).

+





Figuur 3. Overleving en migratie van tetracycline resistente *Clostridium perfringens* (Stappen *et al.*, 1989).

1 de berekening is opnieuw uitgevoerd op basis van een ander cijfer voor de hoeveelheid gemedicineerd voer (zie paragraaf 2.2)

BRINKMAN PROD. NR. 8



93 30 815

DEPOT. NED. PUBL.



5 055 453