



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport

**De invloed van landbouwactiviteiten op
bijzonder resistente bacteriën in
oppervlaktewater: ESBL en
AmpC-producerende *E. coli*.**

RIVM Briefrapport 2019-0152
H. Blaak et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

**De invloed van landbouwactiviteiten op
bijzonder resistente bacteriën in
oppervlaktewater: ESBL en
AmpC-producerende *E. coli*.**

RIVM Briefrapport 2019-0152
H. Blaak et al.

Colofon

© RIVM 2019

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

DOI 10.21945/RIVM-2019-0152

H. Blaak (auteur), RIVM
M.A. Kemper (auteur), RIVM
R. Mannoensingh (auteur), RIVM
S.E. de Rijk (auteur), RIVM
J.F. Schijven (auteur), RIVM
H. Schmitt (auteur), RIVM
A.M. de Roda Husman (auteur), RIVM

Contact:

Hetty Blaak

Centrum Infectieziektebestrijding\Zoönosen en
Omgevingsmicrobiologie\Milieu

Hetty.blaak@rivm.nl

Met dank aan: Deltares, met name Janneke Klein, voor het samenwerken en delen van relevante informatie over het MNLSO netwerk, en aan alle waterschappen en diverse waterlaboratoria voor hun medewerking en het verzorgen van extra monsters op de MNLSO locaties ten behoeve van dit onderzoek.

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de NVWA in het kader van programma 9 (9.2.16.C, Zoönosen via oppervlaktewater)

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

Nederland

www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

De invloed van landbouwactiviteiten op bijzonder resistente bacteriën in oppervlaktewater: ESBL en AmpC-producerende *E. coli*

In het algemeen komen door landbouw weinig resistente bacteriën in oppervlaktewater, zoals sloten en rivieren. Toch kunnen op sommige momenten en plaatsen grote hoeveelheden resistente bacteriën in het water terechtkomen. Dat hangt af van de hoeveelheid regen en het type landbouwactiviteit.

Vooraf in gemeenten met veel leghennen zijn vaker en meer resistente bacteriën in het oppervlaktewater aangetroffen dan in gemeenten met minder leghennen. De aanwezigheid van andere dieren dan leghennen of het uitrijden van mest blijken geen merkbare invloed te hebben. Lozingen van rioolwater hebben meer effect op het aantal resistente bacteriën dan landbouwactiviteiten. Dit blijkt uit onderzoek van het RIVM.

Resistente bacteriën kunnen in de bodem terechtkomen vanuit de ontlasting van landbouwhuisdieren. Dat kan gebeuren wanneer de mest over het land wordt verspreid of de stallen worden schoongemaakt. Het kan ook via de uitwerpselen van dieren in de wei, zoals koeien en schapen, of van vrije uitlopdieren, zoals leghennen. Door regen kunnen de bacteriën vanuit de bodem in het oppervlaktewater terechtkomen. Hoe meer regenwater, hoe meer dat gebeurt.

Rioolwater wordt op oppervlaktewater geloosd nadat rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) het hebben gezuiverd. Als er heel veel regen valt, is er te veel rioolwater en wordt een deel van het rioolwater ongezuiverd geloosd. Eerder RIVM-onderzoek toonde aan dat lozingen van zowel gezuiverd als ongezuiverd rioolwater de aantallen resistente bacteriën in het oppervlakteater vergroten.

Dit keer zijn 51 wateren in landbouwgebied, verspreid over Nederland, onderzocht. In deze wateren komt geen rioolwater, waardoor de invloed van landbouw goed kon worden onderzocht. Elke maand zijn twee soorten resistente bacteriën (de ESBL-producerende *E. coli* en de AmpC-producerende *E. coli*) gemeten. Deze aantallen zijn gecombineerd met gegevens over het aantal dieren in het gebied en de hoeveelheid mest die over het land is uitgereden. Ook is gekeken naar de het seizoen, omdat niet in alle seizoenen mest wordt uitgereden. Ten slotte zijn gegevens over de hoeveelheid regen gebruikt.

Kernwoorden: landbouw, oppervlaktewater, mest, landbouwhuisdieren, neerslag, antibioticaresistentie, ESBL, AmpC, *E. coli*

Synopsis

The influence of agricultural activities on particularly resistant bacteria in surface water. ESBL and AmpC producing *E. coli*

Generally speaking, not many resistant bacteria end up in surface water such as ditches and rivers as a result of agricultural activities. However, large quantities of resistant bacteria can end up in such waters at certain times and certain locations. This depends on the quantity of rainfall and type of agricultural activity.

In particular, resistant bacteria were found in surface water of municipalities with large numbers of laying hens. The presence of other animals or the spreading of manure on agricultural land does not have any noticeable effect. Discharges of sewage water have more effect on the number of resistant bacteria than do agricultural activities. This was the conclusion of a study carried out by RIVM (National Institute for Public Health and the Environment).

Resistant bacteria can end up in the soil via the faeces of domestic farm animals. This can take place when the manure is spread out over the land or the stalls are cleaned out. It can also take place via the faeces of animals on pasture land, such as cows and sheep, or of free-range animals such as laying hens. Via the rain, the bacteria can then be transported from the soil into the surface water. The more rainfall there is, the more this happens.

Sewage water is discharged into surface water after it has been treated in sewage water treatment plants. However, if heavy rainfall occurs, there is too much sewage water and a part of the sewage water is discharged without being treated. A previous RIVM study showed that discharges of treated as well as untreated sewage water lead to an increase in the numbers of resistant bacteria in the surface water.

For the present study, 51 waters were investigated, located in agricultural areas throughout the Netherlands. No sewage water is discharged into these waters, so that the influence of agriculture can be investigated effectively here. Each month, two types of resistant bacteria (the ESBL producing *E. coli* and the AmpC producing *E. coli*) were measured. These numbers were studied in combination with data on the number of animals in the area and the quantity of manure that was spread onto the soil. The influence of the season was also taken into account, since manure is not spread onto the soil in all seasons. Finally, data on the quantity of rainfall was used.

Keywords: agriculture, surface water, manure, domestic farm animals, rainfall, antibiotic resistance, ESBL, AmpC, *E. coli*

Inhoudsopgave

Samenvatting — 9

1 Inleiding — 11

- 1.1 Achtergrond — 11
- 1.2 Doelstelling — 13
- 1.3 Aanpak — 14

2 Methoden — 15

- 2.1 Het Meetnet Nutriënten Landelijk Specifiek Oppervlaktewater (MNLISO) — 15
- 2.2 Selectie MNLISO locaties — 15
- 2.3 Monsternamen — 19
- 2.4 Isolatie en enumeratie ESBL- en AmpC-producerende *E. coli* — 19
 - 2.4.1 Isolatie — 19
 - 2.4.2 Bevestiging — 20
 - 2.4.3 Bepaling van de concentratie en prevalentie — 20
- 2.5 Moleculaire analyses — 21
 - 2.5.1 ESBL en AmpC-genen — 21
 - 2.5.2 Phylogroep PCR — 21
 - 2.5.3 Multilocus sequence typing — 22
- 2.6 Fenotypische test — 22
- 2.7 Genotype analyse ESBL/AmpC isolaten — 23
- 2.8 Analyses en statistiek — 24
 - 2.8.1 Beschrijving van de variabelen — 24
 - 2.8.2 Univariate analyses — 25
 - 2.8.3 Multivariate analyses — 26

3 Resultaten — 27

- 3.1 Prevalentie en concentraties ESBL/AmpC-EC in landbouw specifiek oppervlaktewater — 27
- 3.2 ESBL-/AmpC-EC waterconcentraties in relatie tot agrarische activiteit — 29
 - 3.2.1 Aantal en typen landbouwhuisdierbedrijven — 29
 - 3.2.2 Uitrijden van mest — 30
 - 3.2.3 Aantallen landbouwhuisdieren per km² — 32
- 3.3 Effect neerslag op ESBL/AmpC-EC in landbouw-specifiek oppervlaktewater — 33
- 3.4 ESBL/AmpC-EC typen in landbouw-specifiek oppervlaktewater — 35
- 3.5 Lineair gemengd effect model — 36

4 Discussie — 39

5 Referenties — 43

6 Bijlagen — 47

- 6.1 Monsterlocaties — 47
- 6.2 Primers gebruikt voor moleculaire analyses — 49
- 6.3 *E. coli* en ESBL/AmpC-EC concentraties per meetpunt en tijdstip — 51
- 6.4 Prevalentie en gemiddelde bacterieconcentraties per locatie — 54
- 6.5 Gebruikte afkortingen — 56

Samenvatting

Aanleiding en doel

Het aquatische milieu speelt mogelijk een rol bij de verspreiding van antibioticaresistente bacteriën. Met het oog op maatregelen om deze verspreiding in te perken is het van belang om in kaart te brengen welke factoren bijdragen aan de emissie van deze bacteriën naar het aquatische milieu, en in welke mate.

Het doel van dit onderzoek was om vast te stellen wat de bijdrage is van de agrarische sector aan het vóórkomen van extended spectrum beta-lactamase (ESBL)- en ampicillinase C (AmpC)-producerende *E. coli* (ESBL/AmpC-EC) in oppervlaktewater.

Aanpak

In 2017 werden 51 oppervlaktewateren in agrarisch gebied herhaaldelijk bemonsterd. De meetpunten maken deel uit van het 'Meetnet Nutriënten Landelijk Specifiek Oppervlaktewater' en zijn voor dit meetnet geselecteerd vanwege geen of zeer geringe invloed van humaan afvalwater. Elke meetlocatie is - voor zover mogelijk - 1 keer per maand bemonsterd; in totaal zijn 586 watermonsters geanalyseerd op de aanwezigheid en de aantallen van ESBL/AmpC-EC.

De resultaten van de metingen zijn geanalyseerd in relatie tot neerslag gegevens van het Koninklijk Nederlands Meteorologisch Instituut (KNMI), en gegevens van het Centraal Bureau voor de Statistiek (CBS) over mestgebruik, aantallen en typen landbouwhuisdierbedrijven en landbouwhuisdierdichtheden op gemeenteniveau.

Resultaten

In totaal waren 28% van de monsters positief voor ESBL-EC en/of AmpC-EC. Op 47 van de 51 locaties werd minimaal een keer ESBL/AmpC-EC aangetroffen. In positieve watermonsters varieerde de concentratie van 3,3 kve/l tot $4,8 \times 10^3$ kve/l (geometrisch gemiddelde 12 kve/l, mediaan 6,7 kve/l). Zowel de prevalentie als de gevonden concentraties waren relatief laag vergeleken met resultaten uit eerder onderzoek naar oppervlaktewater onder invloed van effluent lozingen van rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZIs) en in slootjes direct aangrenzend aan pluimveebedrijven. Op de locaties werden jaargemiddelde ESBL/AmpC-concentraties waargenomen die varieerden van 0,28 kolonievormende eenheden per liter (kve/l) tot $4,0 \times 10^2$ kve/l (gemiddeld 23 kve/l, mediaan 2,8 kve/l). Er leek een zwakke correlatie tussen het aandeel kippenbedrijven in een gebied en de prevalentie (37% vs. 26% positieve monsters; $p=0,02$) en concentraties (gemiddeld 55 vs. 17 kve/l, mediaan 3,6 vs. 2,5 kve/l; $p=0,069$) van ESBL/AmpC-EC in het oppervlaktewater. Daarnaast bleken de jaargemiddelde ESBL/AmpC concentraties gecorreleerd met de leghennendichtheid, zowel in een univariate ($r_s=0,393$, $p=0,016$; Spearman rangcorrelatie) als in multivariate analyse ($p=0,044$; lineair gemengd effect model). De aanwezigheid van de overige onderzochte landbouwhuisdieren (varkens, melkvee, vleeskalveren en vleeskuikens) en landbouwhuisdierbedrijven correleerde niet met de aanwezigheid van ESBL/AmpC-EC in water. Vleeskalverendichtheid correleerde daarentegen wel met de totale *E. coli*

concentraties in oppervlaktewater (Spearman: $r_s=0,457$, $p=0,003$; lineair gemengd effect model: $p=0,007$).

Er was geen associatie tussen het voorkomen van ESBL/AmpC-EC in oppervlaktewater en de totale hoeveelheid uitgereden mest in het gebied of met de periode van het jaar (d.w.z. binnen of buiten het mestuitrijdseizoen). Voor totale *E. coli* waren de concentraties in water zelfs significant lager binnen het mestuitrijdseizoen dan daarbuiten. Neerslag had een zeer sterk effect op de prevalentie van ESBL/AmpC-EC en op ESBL/AmpC-EC (en totale *E. coli*) concentraties in water, wat verklaard kan worden door het feit dat met neerslag mest en dierlijke uitwerpselen van landbouwgrond en erven afspoelen naar oppervlaktewater. Het effect van extreme neerslag (meer dan 10mm in 24 uur) was voor zowel ESBL/AmpC-EC als *E. coli* groter binnen het mestuitrijdseizoen dan daarbuiten. Dit duidt erop dat ondanks de afwezigheid van een duidelijke associatie met de hoeveelheden uitgereden mest in de huidige studie, mestgebruik toch het voorkomen van deze bacteriën in oppervlaktewater beïnvloedt.

De ESBL-isolaten in het oppervlaktewater in agrarisch gebied leken wat betreft genotype meer op die in mest dan die in RWZI effluent, wat in overeenstemming is met een grotendeels agrarische beïnvloeding van de onderzochte locaties.

Conclusies:

Agrarische activiteiten beïnvloeden in beperkte mate het voorkomen van ESBL/AmpC-EC in het oppervlaktewater. Factoren die een positief effect hebben op ESBL/AmpC-EC concentraties in water zijn leghennendichtheid en neerslag. Er werd geen verband aangetoond met het uitrijden van mest. De mate van beïnvloeding van oppervlaktewater gerelateerd aan agrarische activiteit is minder dan dat gerelateerd aan humaan afvalwater lozingen. De afhankelijkheid van neerslag en het diffuse karakter van agrarische bronnen betekent waarschijnlijk dat hoewel de beïnvloeding van oppervlaktewater vanuit agrarische bronnen het grootste deel van de tijd gering is, er van tijd tot tijd piek-emissies plaats kunnen vinden.

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Antibioticaresistentie

Wereldwijd komen op steeds grotere schaal infecties met bacteriën voor die resistent zijn voor antibiotica. Infecties met resistente bacteriën zijn moeilijk te behandelen, waardoor patiënten langer en ernstiger ziek zijn. In het ergste geval worden bacteriën tegen zoveel antibiotica resistent dat er helemaal geen behandeling meer mogelijk is. Dat wil zeggen dat mensen dood kunnen gaan aan infecties die tot nu toe altijd goed te genezen waren (bijvoorbeeld een blaas- of longontsteking). Om de beschikbaarheid van antibiotica als medicijn in de toekomst veilig te stellen, is het van belang om maatregelen te nemen die het ontstaan en de verspreiding van resistentie beperken. Daarvoor is het noodzakelijk om inzicht te hebben in de mechanismen van verspreiding.

Ontstaan en verspreiding van antibioticaresistentie

Antibioticaresistente bacteriën ontstaan door het gebruik van antibiotica in mens en dier. In Nederland is er in de humane gezondheidszorg een restrictief beleid in het gebruik van antibiotica, en worden relatief weinig antibiotica gebruikt vergeleken met andere landen. In Nederland komen resistente bacteriën dan ook minder vaak voor bij mensen dan in sommige andere landen, zoals landen in het Middellandse zeegebied en Azië. Daarentegen zijn in de Nederlandse agrarische sector gedurende het eerste decennium van deze eeuw antibiotica juist veel gebruikt. Hoewel dit gebruik sinds 2012 sterk is teruggedrongen (MARAN 2018) is de prevalentie van antibioticaresistente bacteriën in landbouwhuisdieren nog steeds hoog. Dit is vooral het geval in pluimvee, varkens en vleeskalveren (MARAN 2018, Schmitt et al. 2019).

Antibiotica resistente bacteriën kunnen deel uit maken van de darmflora, dat wil zeggen relatief onschadelijke bacteriën die bij ieder mens of dier in de darmen zitten, zoals *Escherichia coli*. Gezonde mensen worden hier niet ziek van. Daarom komt het veel voor dat mensen resistente bacteriën in de darmen hebben ("drager" zijn) zonder dat ze dat merken. Ze raken ze vanzelf weer kwijt. Maar het kan ook gebeuren dat ze de bacteriën doorgeven aan kwetsbare mensen, zoals ouderen en ziekenhuispatiënten. Deze mensen kunnen er wel ziek van worden. En dan is de ziekte moeilijker te behandelen. Resistente darmbacteriën kunnen zich makkelijk verspreiden via direct contact tussen mensen (bijvoorbeeld via hand-hand contact gevolgd door hand-mond contact), en tussen mens en dier. Daarnaast kunnen resistente bacteriën zich verspreiden via voedsel en via het milieu.

ABR in het milieu

Onderzoek heeft aangetoond dat in Nederlands oppervlaktewater antibioticaresistente (ABR) darmbacteriën voorkomen (Blaak et al. 2014, Blaak et al. 2015a, Blaak et al. 2010, Blaak et al. 2011). Deze bacteriën komen hierin terecht met ontlasting van mensen en (landbouwhuis)dieren die deze bacteriën bij zich dragen. Via oppervlaktewater kunnen deze bacteriën zich weer verspreiden naar andere mensen en dieren. Mensen kunnen deze bacteriën binnenkrijgen

tijdens bijvoorbeeld recreatie in oppervlaktewater, maar mogelijk ook indirect wanneer oppervlaktewater wordt gebruikt voor de irrigatie van gewassen. Weidedieren (zoals koeien, schapen en paarden) en wilde dieren kunnen resistente bacteriën binnenkrijgen door het drinken van of foerageren in besmet oppervlaktewater. Om verspreiding van resistentie (kosten-)efficiënt te kunnen inperken is het van belang om te weten wat de relatieve bijdrage is van verschillende fecale bronnen aan het voorkomen van ABR bacteriën in oppervlaktewater. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat gezuiverd en ongezuiverd rioolwater belangrijke bronnen zijn van ABR darmbacteriën in oppervlaktewater (Blaak et al. 2018). Hoewel dezelfde studies een geringere invloed vanuit de landbouw suggereerden, konden er vanwege het beperkte aantal meetlocaties en meetpunten geen harde conclusies getrokken worden.

Landbouw en ABR in het milieu

Landbouw kan op verschillende manieren het voorkomen van ABR in het aquatische milieu beïnvloeden. Dierlijke mest bevat vaak antibioticaresistente bacteriën en deze komen met het uitrijden van mest in en op de bodem terecht. Naar schatting worden op deze manier jaarlijks ongeveer 6×10^{15} ESBL-producerende *E. coli* met mest in en op de bodem gebracht (Schmitt et al. 2019). In Nederland bestaat het overgrote deel (96%) van de geproduceerde en uitgereden mest uit drijfmest afkomstig van rundvee en varkens (CBS 2018, Schmitt et al. 2017). Een klein aandeel (4%) bestaat uit vaste mest, voornamelijk afkomstig van pluimvee, rundvee en kleine herkauwers. Voor het uitrijden van vloeibare en vaste mest bestaan verschillende regels, afhankelijk van de grondsoort (RVO 2018b). Drijfmest wordt meestal in de bodem geïnjecteerd.

Een deel van deze bacteriën kan uit de mest vrijkomen en naar oppervlaktewater afspoelen met neerslag of irrigatie. Hoe groot dat deel is hangt af van de efficiëntie van afspoeling vanuit de mest en de overleving van de bacteriën in de mest en bodem. Factoren die hierbij een rol spelen zijn: timing van de neerslag ten opzichte van het mestuitrijden, de intensiteit en duur van de regenbui, het type mest (type dier, vast of vloeibaar), de versheid en methode van verwerking van de mest, de methode van opbrengen (injecteren of opbrengen), en de bodemsoort en vegetatie (Blaustein et al. 2015). Het deel wat afspoelt kan heel sterk variëren: voor *E. coli* zijn waarden beschreven tussen de 0,01% en 50% (Blaustein et al. 2015).

Naast op land gebrachte mest komen resistente bacteriën ook op land terecht met uitwerpselen van weidedieren (zoals paarden, koeien, schapen) en vrije uitloopdieren (zoals leghennen, scharrelvarkens). Voor de mate van afspoeling van deze bacteriën spelen in principe dezelfde factoren een rol als voor opgebrachte mest. Verschillen in de timing van de introductie in het milieu, de versheid van de mest en de plek waar de mest terechtkomt veroorzaken mogelijk verschillen in de mate van afspoeling van bacteriën vanuit uitwerpselen van weide- en vrije uitloop dieren en opgebrachte mest. Zo wordt mest 'eenmalig' in grote hoeveelheden uitgereden, is het meestal langere tijd opgeslagen geweest en/of bewerkt (bijv. opslag, scheiding dunne en dikke fractie, compostering) en wordt het meestal geïnjecteerd (drijfmest).

Daarentegen is er vanuit uitwerpselen van weide- en vrije uitloop dieren een dagelijkse aanvoer van kleinere hoeveelheden uitwerpselen, komt het altijd op de bodem terecht en is het (afhankelijk van de timing van de neerslag) relatief vers. Ongeveer 11% van de in Nederland geproduceerde mest is afkomstig uit de wei (CBS 2018).

Tenslotte kunnen resistente bacteriën vanuit landbouw in het milieu terecht komen door afspoeling van mest van erven van veehouderijen. Dit is eerder aangetoond voor vleeskuikenbedrijven op het moment van schoonmaken van stallen (Blaak et al. 2015b). Naast spelwater tijdens schoonmaken heeft ook neerslag een effect op afspoeling van bedrijven.

ESBL-en AmpC producerende E. coli

Een veel onderzochte vorm van resistentie bij *E. coli* is resistentie tegen een grote groep van klinisch relevante antibiotica, de beta-lactam antibiotica. Deze groep bestaat weer uit meerdere (sub)klassen van antibiotica met iets andere werkingen; het meest bekende antibioticum, penicilline, behoort tot een van deze subklassen. Er zijn *E. coli*'s die resistent zijn tegen bijna alle (sub)klassen van antibiotica uit de beta-lactam groep. De belangrijkste hiervan is de zogenaamde "extended-spectrum-beta-lactamase-producerende *E. coli*, of ESBL-EC. ESBL is een enzym dat een groot deel van de beta-lactam antibiotica inactieveert, waardoor de bacterie die dit enzym produceert resistent wordt. ESBL-EC kunnen grote problemen geven in ziekenhuizen, omdat infecties (urinereweg-, maagdarmkanaal- en bloedinfecties) moeilijk te behandelen zijn. ESBL-EC vallen daarom onder de zogenaamde "Bijzonder Resistente Micro Organismen of BRMO's". Dit is een groep van resistente bacteriën die door de gezondheidszorgsector gedefinieerd is omdat zowel de behandeling als de verzorging van patiënten met dergelijke bacteriën bijzondere aandacht vereisen. ESBL-EC kan ook bij mensen voorkomen zonder dat er klachten zijn. Zo is ongeveer 5% van alle Nederlanders drager van ESBL-EC. Omdat in Nederland in het verleden bij landbouwhuisdieren relatief veel antibiotica werden gebruikt, komen ESBL-EC ook frequent voor bij deze dieren, vooral bij pluimvee, vleesvarkens en vleeskalveren. Het AmpC enzym heeft een iets andere maar vergelijkbare activiteit als het ESBL en de consequenties voor behandeling zijn daarom vergelijkbaar. *E. coli* die AmpC kunnen produceren zijn eerder ook aangetoond bij mensen en landbouwhuisdieren, met name in kippen (Ewers et al. 2012, Voets et al. 2013).

1.2 Doelstelling

Het hoofddoel van het onderzoek was het vaststellen van de bijdrage van de agrarische sector aan de aanwezigheid van ABR bacteriën in oppervlaktewater.

Te adresseren deeldoelen waren:

1. Verkrijgen van kwantitatieve gegevens over de emissie van ESBL- en AmpC-EC vanuit de agrarische sector op landelijk niveau.
2. Vergelijken van deze emissie met emissie uit humaan afvalwater lozingen (gegevens verkregen uit een ander project).

3. Verkrijgen van inzicht in de bijdrage van mestuitrijden (mestuitrijdseizoen vs. daarbuiten)
4. Verkrijgen van inzicht in het effect van neerslag.
5. Verkrijgen van inzicht in verschillen tussen regio's met verschillende typen bedrijven.

1.3 Aanpak

In eerste instantie werd beoogd om met het onderzoek vast te stellen wat de bijdrage is van bedrijven met landbouwhuisdieren aan de aanwezigheid van ABR in het waterige milieu. De bereidheid van bedrijven om hier aan mee te werken was echter zeer gering. Er is daarom gekozen voor een alternatieve aanpak, waarbij metingen werden verricht in oppervlaktewater in agrarisch gebied, wat niet onder invloed staat van lozingen van huumaan afvalwater. Er is hiervoor gebruik gemaakt van meetpunten uit het Meetnet Nutriënten Landelijk Specifiek Oppervlaktewater (MNLISO). Dit meetnet is een samenwerking tussen Deltares en de waterschappen, opgericht om de invloed van het mestbeleid op oppervlaktewater vast te kunnen stellen.

Met de aangepaste aanpak is de focus van het onderzoek verschoven van enkel de afspoeling van bedrijven, naar de som van activiteiten in de agrarische sector waarmee fecaliën in het milieu gebracht worden, waaronder erfafspoeling, het uitrijden van mest en het houden van weide- en vrije uitloop dieren. Door de resultaten van de huidige studie te combineren met bevindingen uit eerdere RIVM studies in oppervlaktewater en in mest is een beter inzicht verkregen in de relatieve bijdrage van de agrarische sector.

2 Methoden

2.1 Het Meetnet Nutriënten Landelijk Specifiek Oppervlaktewater (MNLZO)

Het MNLZO is een samenwerking tussen Deltares en de waterschappen, met als doel de invloed van het mestbeleid op de kwaliteit van oppervlaktewater vast te kunnen stellen. Hiertoe zijn "landbouw specifieke" meetpunten geselecteerd uit bestaande meetnetten van waterschappen. De term "landbouw specifiek" geeft aan dat er meetlocaties zijn gekozen die niet of minimaal beïnvloed worden door andere, niet-natuurlijke nutriëntenbronnen. Voor de selectie van "landbouw specifieke" locaties zijn er bepaalde criteria gehanteerd voor wat betreft de ligging (Klein et al. 2012a):

- Hoofdzakelijk landbouw in bovenstrooms stroomgebied.
- Geen grote puntbronnen in bovenstrooms stroomgebied, zoals rioolwaterzuiveringen (RWZI's) en industriële lozingen. Bij voorkeur ook geen overstorten in het bovenstrooms gebied, maar enkele kleine overstorten die alleen zelden in gebruik zijn, zijn toegestaan.
- Geen groot stedelijk gebied bovenstrooms. Als een meetpunt een groter gebied afwatert, zijn enkele dorpjes in het stroomgebied wel toegestaan.
- Geen aanvoer uit Duitsland en/of België tenzij er genoeg informatie is over het Duitse/Belgische deel van het stroomgebied.
- Geen inlaat van gebiedsvreemd water. Dit criterium is in sommige waterschappen in met name laag-Nederland moeilijk te omzeilen. In de waterschappen waar geen waterlopen aanwezig zijn die niet beïnvloed worden door inlaatwater is gezocht naar meetpunten die zo min mogelijk inlaatwater ontvangen, bijvoorbeeld omdat ze ver van een inlaatpunt liggen of omdat er in de desbetreffende watergang bijna nooit water wordt ingelaten. Een andere manier is om kleinere waterlopen te selecteren, omdat deze veelal minder door inlaatwater beïnvloed worden dan de grote doorgaande waterlopen.
- Natuurlijke belasting, zoals kwel, is toegestaan als het niet mogelijk is meetpunten te selecteren zonder kwel. Wel is geprobeerd meetpunten te selecteren met zo min mogelijk kwel.
- De waterloop moet permanent watervoerend zijn. Als een waterloop echter heel zelden droog valt is dit geen reden het desbetreffende meetpunt niet mee te nemen.

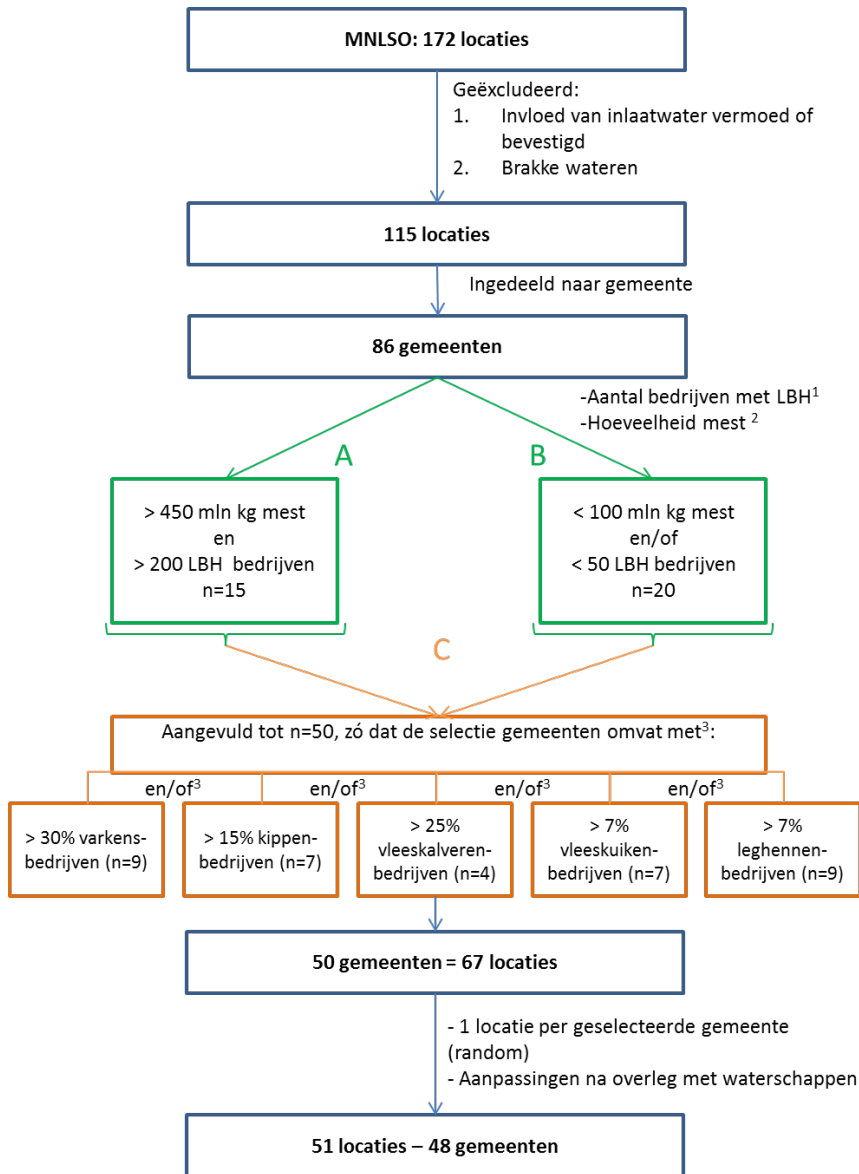
In totaal omvat het MNLZO 172 meetpunten ("toestandmeetlocaties") die elk 12 keer per jaar worden bemonsterd.

2.2 Selectie MNLZO locaties

Uit de 172 MNLZO meetpunten zijn 50 geselecteerd voor het huidige onderzoek (figuur 2.2-1). De selectie procedure bestond uit een negatieve selectie (exclusiecriteria) gevolgd door een positieve selectie (inclusiecriteria). Geëxcludeerd zijn brakke wateren en wateren waarvan vermoed werd dat er sprake is van invloed van inlaatwater; in sommige

gevallen was dit vermoeden bevestigd door verhoogde waarden van gadolinium wat gebruikt wordt als indicator voor aanwezigheid van humaan afvalwater (Klein et al. 2012b). De overgebleven 115 locaties zijn ingedeeld naar gemeente. De inclusiecriteria zijn gebaseerd op de agrarische activiteiten op gemeentelijk niveau, afgeleid uit de aantallen landbouwhuisdierbedrijven (LBH bedrijven) per gemeente (CBS 2015b), en de totale uitgereden hoeveelheden mest (CBS 2014). Er zijn 50 gemeenten geselecteerd, zodanig dat de selectie gemeenten omvatte met relatief hoge agrarische activiteit en gemeenten met geringe agrarische activiteit, alsook gemeenten die verschillen voor wat betreft de samenstelling van type landbouwhuisdieren (zie figuur 2.2-1). Per gemeente is 1 van de MNLSO selecties random geselecteerd. Deze random selectie is in een enkel geval op advies van de betrokken waterschappen nog aangepast (het ene water is toch 'landbouw specifieker' dan het andere). Dit heeft geleid tot de toevoeging van één niet-MNLSO meetpunt, resulterend in 51 locaties, en een uiteindelijk aantal van 48 gemeenten (figuur 2.2-1, tabel 2.2-1). Het niet-MNLSO meetpunt is wel een landelijk specifiek meetpunt en maakt deel uit van een bestaand meetnet van het betreffende waterschap.

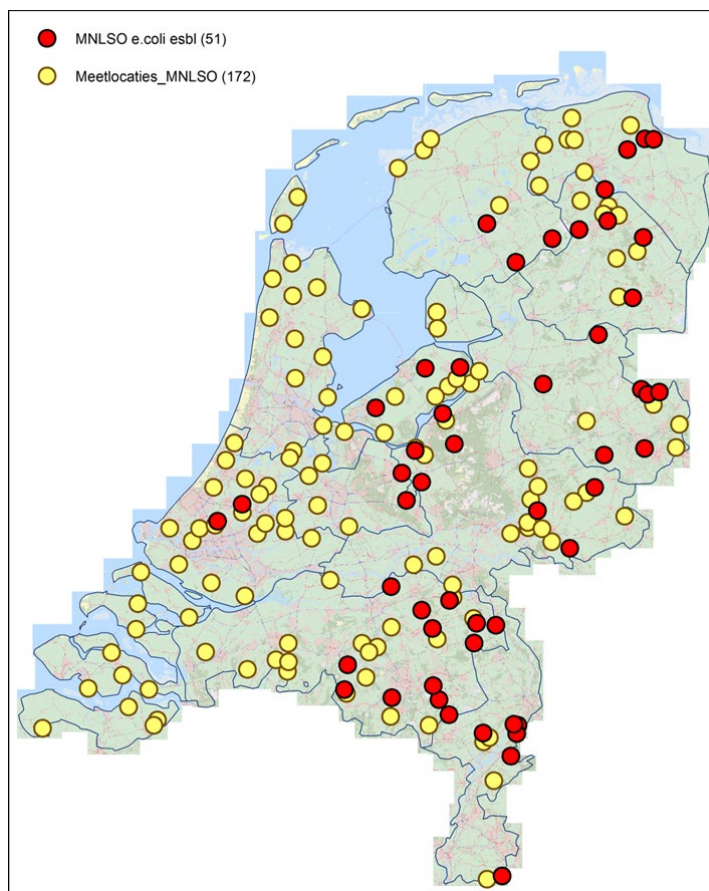
Als gevolg van de exclusie van brak water en locaties die hoogst waarschijnlijk onder invloed van inlaatwater staan, zijn wateren in het westelijke deel van het land sterk ondervertegenwoordigd (figuur 2.2-2). De geïncludeerde locaties liggen in het beheergebied van waterschap Aa en Maas (n= 9), waterschap de Dommel (n=4), hoogheemraadschap Delfland (n=1), waterschap Drents Overijsselse Delta (n=1), wetterskip Fryslân (n=3), waterschap Hunze en Aas (n=6), waterschap Limburg (n=6), waterschap Noorderzijlvest (n=1), waterschap Rijn en IJssel (n=3), hoogheemraadschap Schieland en de Krimpenerwaard (n=1), waterschap Vallei en Veluwe (n=6), waterschap Vechtstromen (n=7) en waterschap Zuiderzeeland (n=3). Zie bijlage 6.1 voor een overzicht van de bemonsterde locaties.



Figuur 2.2-1. Selectie van onderzoekslocaties uit MNLISO meetpunten.
 1.LBH=landbouwhuisdieren; meegewogen zijn varkens, pluimvee en rundvee. 2. Het totaal aan dunne rundvee, vleeskalveren, en varkensmest, en vaste pluimveemest. 3. De som van alle groepen A+B+C is groter dan 50, omdat er enig overlap is tussen de verschillende subgroepen in "C", en tussen "A" en "C" en "B" en "C".

Tabel 2.2-1. Beschrijving geselecteerde meetpunten en indeling in groepen wat betreft agrarische activiteit.

Groep	Omschrijving	Aantal meet-locaties	Aantal gemeenten
Hoge agrarische activiteit	>450 mln kg mest en >200 LBH bedrijven	17	17
Lage agrarische activiteit	<100 mln kg mest en/of <50 LBH bedrijven	16	16
Veel LBH bedrijven	>200	20	18
Weinig LBH bedrijven	<50	13	13
Veel mest uitgereden	>450 mln kg	16	14
Weinig mest uitgereden	<100 mln kg	16	16
Varkensbedrijven hoog	>30% is varkensbedrijf	11	9
Kippenbedrijven hoog	>15% is kippenbedrijf	9	8
Vleeskuikenbedrijven hoog	>7% is vleeskuikenbedrijf	9	8
Leghennenbedrijven hoog	>7% is leghennenbedrijf	9	9
Vleeskalverenbedrijven hoog	>25% is vleeskalverenbedrijf	4	4
Totaal	Totaal	51	48



Figuur 2.2-2. Selectie van monsterlocaties. De symbolen geven de MNLISO meetpunten weer, met in rood de voor de huidige studie geselecteerde locaties.

2.3 Monstername

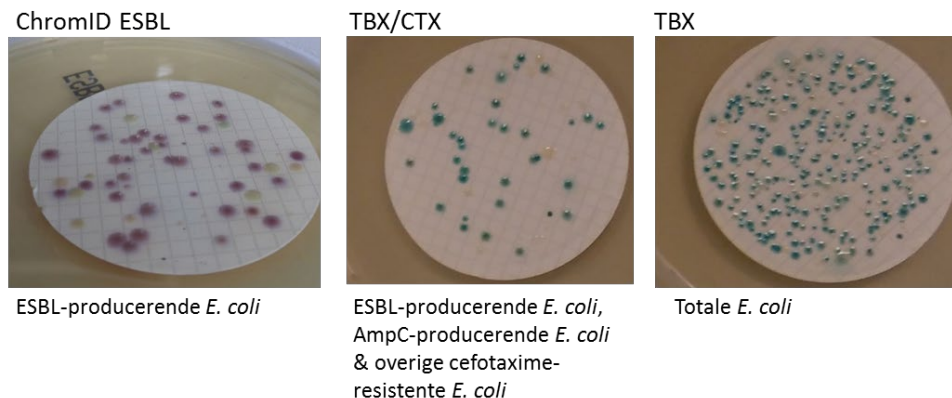
Voor het meetnet MNLSO wordt elke locatie 12 of 13 keer per jaar bemonsterd door de waterschappen of daartoe ingehuurd waterlaboratoria; dit geldt ook voor de 51e en niet MNLSO locatie. Vanaf 9 januari 2017 tot en met 20 december 2017 is op de MNLSO locaties een extra liter water genomen ten behoeve van het huidige onderzoek. Gebaseerd op de monsternamerequentie van de geselecteerde locaties was het in 2017 aantal geplande monsters 614. In werkelijkheid zijn 586 monsters onderzocht in het huidige onderzoek. De discrepantie wordt veroorzaakt door de exclusie van monsters die vóór 9 januari genomen werden (n=6), niet geleverde monsters door miscommunicatie met waterschappen/waterlaboratoria (n=3), een afgekeurd experiment (n=1) en drooggevallen locaties (n=18). Zeven van de meetpunten hebben gedurende 1 of meerdere (maximaal 5) maanden droog gestaan. De monsters werden gekoeld naar het RIVM getransporteerd en opgeslagen en binnen 24 uur verwerkt voor analyse volgens standaard voorschriften (Anonymous 1992).

2.4 Isolatie en enumeratie ESBL- en AmpC-producerende *E. coli*

2.4.1

Isolatie

In de oppervlaktewatermonsters zijn de concentraties bepaald van *Escherichia coli*, ESBL-producerende *E. coli* (ESBL-EC) en AmpC-producerende *E. coli*. Hiervoor werd het water over membraanfilters gefiltreerd en werden de filters op selectieve voedingsbodems gekweekt: beta-x-glucuronidase (TBX) agar voor *E. coli*, ChromID ESBL agar voor ESBL-EC, en TBX met daaraan toegevoegd 1 µg/ml cefotaxime (TBX/CTX) voor ESBL-EC en AmpC-producerende *E. coli*. Op TBX/CTX agar kunnen alle *E. coli* groeien die resistent zijn tegen cefotaxime, onafhankelijk van het resistentiemechanisme. Als gevolg hiervan kunnen op dit medium ESBL-EC, AmpC-EC maar ook cefotaxime-resistente *E. coli* groeien die geen ESBL of AmpC produceren. Van elk monster werden verschillende volumes gefiltreerd en gekweekt: 3, 10, 30 en 100ml voor incubatie op TBX agar, en drie keer 100ml voor incubatie op elk ChromID ESBL agar en TBX/CTX. Het totaal gefiltreerde volume bepaalt de detectiegrens van de analyse. *E. coli* en ESBL/AmpC-EC werden gekweekt door 4 uur te incuberen bij 37°C, gevolgd door 18 tot 24 uur bij 44°C. Na deze incubatie werden de groene en roze kolonies



Figuur 2.4-1. Isolatie van ESBL- en/of AmpC-producerende *E. coli* gebruikt makend van selectieve agar.

geteld op respectievelijk TBX en ChromID ESBL agar (figuur 2.4-1). Uit de koloniaantallen en de geanalyseerde volumes werden de bacterieconcentraties berekend. Hiervoor worden alleen filters met minder dan 200 kolonies gebruikt. In het geval dat het laagste gebruikte volume >200 kolonies bevatte werden de volgende dag extra lagere volumes gefiltreerd.

2.4.2 *Bevestiging*

Voor het vaststellen van de ESBL- en AmpC-concentraties is het nodig te bevestigen of de karakteristieke kolonies ook werkelijk ESBL dan wel AmpC produceren. Per monster werden maximaal zes kolonies afgeënt en rein gekweekt voor verdere analyses: drie elk van ChromID ESBL en van TBX/CTX (indien op 1 van de 2 media minder dan drie kolonies waren werden alle kolonies van dat medium afgeënt, en met kolonies van het andere type medium aangevuld tot maximaal 6). Isolaten afkomstig van ChromID ESBL medium (n= 241) werden bevestigd als ESBL door middel van de detectie van ESBL-genen met behulp van PCR en sequenzen (paragraaf 2.5). Isolaten waarvoor op deze manier geen ESBL-genen konden worden aangetoond zijn vervolgens bevestigd door middel van een fenotypische test (paragraaf 2.6). Isolaten afkomstig van TBX/CTX (n=302) werden eerst getest in een fenotypische test (paragraaf 2.6). Isolaten op deze manier geïdentificeerd als ESBL werden onderzocht op het type ESBL-gen door middel van PCR en sequenzen. Isolaten op deze manier bevestigd als AmpC werden onderzocht op de aanwezigheid en het type van het bla_{CMY}-gen door middel van PCR en sequenzen.

2.4.3 *Bepaling van de concentratie en prevalentie*

E. coli concentraties werden berekend uit het kolonie aantal en de gefiltreerde volumes, zoals weergegeven door formule (i):

$$C_{\text{ecoli}} = \frac{\sum (N_{1...n})}{\sum (V_{1...n})} \times 1000 \text{ kve/l} \quad (\text{i})$$

Hierin is $N_{1...n}$ het aantal groene kolonies is op filter 1 tot en met n, en $V_{1...n}$ het volume (ml) gefiltreerd op filter 1 tot en met n.

Voor de berekening van ESBL-EC en AmpC-EC concentraties zijn formules (ii) tot en met (iv) gebruikt:

$$C_{\text{ESBL-EC (ChromID ESBL)}} = \frac{\sum (N_{1...n} \text{ roze}) \times \% \text{ bevestigd ESBL}}{\sum (V_{1...n})} \times 1000 \text{ kve/l} \quad (\text{ii})$$

$$C_{\text{ESBL-EC (TBX/CTX)}} = \frac{\sum (N_{1...n} \text{ groen}) \times \% \text{ bevestigd ESBL}}{\sum (V_{1...n})} \times 1000 \text{ kve/l} \quad (\text{iii})$$

$$C_{\text{AmpC-EC (TBX/CTX)}} = \frac{\sum (N_{1...n} \text{ roze}) \times \% \text{ bevestigd AmpC}}{\sum (V_{1...n})} \times 1000 \text{ kve/l} \quad (\text{iv})$$

Waarbij het percentage bevestigd ESBL of AmpC gebaseerd is op de resultaten van moleculaire analyse en fenotypische tests per monster. De ESBL-EC concentratie is vastgesteld als de hoogste van de twee uitkomsten van formule (ii) en (iii). De totale concentratie van ESBL- en AmpC-*E. coli* (ESBL/AmpC-EC) is de som van ESBL-EC (d.w.z. hoogste van ii en iii) en AmpC-EC (iv).

Voor het bepalen van de prevalentie van ESBL-EC is het totaal aantal monsters gebruikt met bevestigde ESBL-EC op ChromID ESBL en/of op TBX/CTX. De prevalentie van AmpC-EC is gebaseerd op het aantal monsters met bevestigde AmpC-EC op TBX/CTX.

Om het vóórkomen van ESBL-EC in het landelijk specifiek oppervlaktewater in perspectief te plaatsen zijn deze vergeleken met prevalentie en concentraties uit eerder RIVM onderzoek in ander Nederlands oppervlaktewater en in afvalwater (tabel 2.4-1). Omdat in die studies alleen ChromID ESBL agar was gebruikt voor detectie en enumeratie van ESBL-EC, is voor het maken van die specifieke vergelijking de uitkomst van formule (ii) gebruikt.

Tabel 2.4-1. Data gebruikt afkomstig uit andere studies gebruikt voor referentie.

Type water	Aantal verschillende meetpunten	Aantal monsters	Referentie
Oppervlaktewater landelijk ¹	3	49	(Blaak et al. 2018)
Slootjes rond pluimveebedrijven	20	35	(Blaak et al. 2015b)
Oppervlaktewater natuur ²	1	6	(Blaak et al. 2018)
Oppervlaktewater beïnvloed door RWZI Effluent ³	2	24	(Blaak et al. 2018)
RWZI effluent	100	100	(Blaak et al. 2018, Schmitt et al. 2017)

¹Niet beïnvloed door RWZIs; ²Oostvaardersplassen, geen agrarische en geen humane invloed; ³metingen bij 2 RWZIs, 100-500m benedenstreams.

2.5 Moleculaire analyses

2.5.1 ESBL en AmpC-genen

Alle isolaten werden onderzocht op de aanwezigheid en het type van ESBL-genen, door middel van PCR en sequencing. Onderzocht zijn de genen van de CTX-M-familie: groep-1, groep-2, groep-8, groep-9 en groep 25, en de TEM-, SHV en OXA-families (Dallenne et al. 2010). Daarnaast werden alle isolaten met een non-ESBL fenotype (zie paragraaf 2.6) onderzocht op de aanwezigheid van AmpC-genen van de CMY-groep (Dallenne et al. 2010). Voor de moleculaire analyses werd een klein beetje koloniemateriaal opgenomen in ultrapuur water (milliQ). Alle PCRs werden uitgevoerd op 1µl van een isolaat oplossing, met behulp van multiplex PCR kit van Qiagen. De gebruikte primers staan in bijlage 6.2. De PCR-producten werden gezuiverd (met ExoSAP-IT van GE Healthcare) en gesequenced met dezelfde primers als waar het PCR product mee was gemaakt. De verkregen sequenties werden vergeleken met referentiesequenties (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>) gebruikmakend van BioNumerics software (versie 7.1; Applied Maths).

2.5.2 Phylogroep PCR

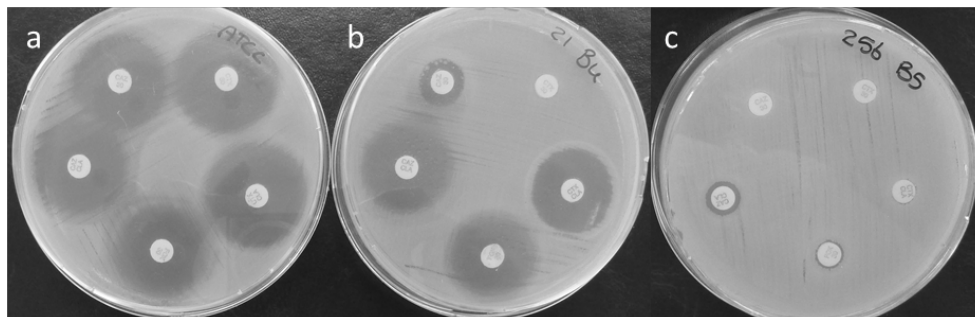
De phylogroep werd bepaald door middel van een PCR die de aanwezigheid aantoonde van *gadA*, *chuA* en *yjaA* genen en het TspE4.C2 DNA fragment, gebruikmakend van primers en PCR programma's zoals eerder is beschreven in de literatuur (Doumith et al. 2012).

2.5.3 *Multilocus sequence typing*

Isolaten met phylogroep B2₃ werden verder gekarakteriseerd door middel van multilocus sequence typing (MLST), om de prevalentie van sequentietype 131 (ST131) vast te stellen. *E. coli* met genotype B2₃ is met name geassocieerd met *E. coli* afkomstig uit mensen (Carlos et al. 2010), en ST131 *E. coli* met ESBL-genen (met name CTX-M-15) zijn wijdverspreid en geassocieerd met klinische isolaten (Petty et al. 2014). Voor deze analyse werden zeven zogenaamde 'huishoudgenen' gePCRd en gesequenced (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* en *recA*) zoals dat eerder is beschreven in de literatuur (Wirth et al. 2006). De gebruikte primers zijn zoals beschreven op de *E. coli* MLST database webpagina: <http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/mlst/dbs/Ecoli>. Om het sequence type vast te stellen werden de verkregen sequenties vergeleken met sequenties in de online database, gebruikmakend van BioNumerics software (version 7.1; Applied Maths).

2.6 **Fenotypische test**

Verdachte ESBL- of AmpC-producerende *E. coli* isolaten werden getest op ESBL-productie door een zogenaamde 'disk-diffusie test' volgens de richtlijnen die beschreven zijn door het Clinical & Laboratory Standards Institute (Clinical and Laboratory Standards Institute 2015). Hierbij wordt gebruik gemaakt van vijf 'Sensi-Discs': met cefotaxime, met ceftazidime, met cefotaxime in combinatie met clavulaanzuur, met ceftazidime in combinatie met clavulaanzuur en met ceftoxitine. In het kort houdt de methode in dat een voedingsbodem met Mueller Hinton agar wordt bestreken met een suspensie van de bacteriestam, zodanig dat na incubatie een homogene laag met gegroeide bacteriën wordt verkregen. Direct na het bestrijken van de voedingsbodem worden de 5 disks op deze laag geplaatst en worden de platen overnacht bebroed bij 36±1°C. De antibiotica in de disks verspreiden zich door de voedingsbodem door middel van diffusie, waarbij de hoogste concentratie antibioticum dicht bij de disk is. Een resistente bacterie kan tot dicht bij de disk groeien, terwijl een gevoelige bacterie dat niet kan waardoor er een zone zonder groei (te herkennen als een 'heldere' zone) rond de disk verschijnt (figuur 2.6-1). Clavulaanzuur remt de werking van ESBLs, waardoor een ESBL-producerende bacterie gevoelig wordt voor de antibiotica. ESBL-producerende isolaten zijn gedefinieerd als stammen die resistent zijn tegen cefotaxime (zone diameter ≤ 22 mm) en/of ceftazidime (zone diameter ≤ 17 mm), én een toename laten zien in de zone diameter (≥ 5 mm) bij de disks waar ook clavulaanzuur in zit (Clinical and Laboratory Standards Institute 2015). AmpC-producerende isolaten zijn gedefinieerd als stammen die resistent zijn tegen cefotaxime (zone diameter ≤ 22 mm) en/of ceftazidime (zone diameter ≤ 17 mm) én tegen ceftoxitine (zone diameter ≤ 14 mm), én géén toename laten zien in de zone diameter (≥ 5 mm) bij de disks waar ook clavulaanzuur in zit (Clinical and Laboratory Standards Institute 2015).



Figuur 2.6-1.. Fenotypische test om ESBL- of AmpC-productie vast te stellen. Weergegeven zijn voorbeelden van een compleet gevoelige stam (a), een ESBL-producerende stam (b) en een AmpC-producerende stam (c).

2.7 Genotype analyse ESBL/AmpC isolaten

In totaal werden uit de watermonsters 535 ESBL-EC en AmpC-EC isolaten geïsoleerd. Aan elk van deze isolaten is een genotype toegekend gebaseerd op phylogroep, het type CTX-M-, TEM- en SHV-gen, en de aan/afwezigheid van een OXA gen. Voor verdere analyses betreffende prevalenties van ESBL- en AmpC-genen zijn per monster de isolaten met verschillende genotypen geselecteerd. Met andere woorden, als onder isolaten afkomstig uit één monster meerdere hetzelfde genotype hadden werd hiervan één in de verdere analyses meegenomen. Deze selectie leverde 307 waterisolaten op die gebruikt zijn voor verder analyses.

Hoewel er grote overlap is in ESBL-genen en AmpC-genen die voorkomen bij mensen en dieren, verschillen sommige genen in hoe vaak ze voorkomen bij mensen of dieren. Zo komen de ESBL-genen *CTX-M-1*, *SHV-12*, *TEM-52* en het AmpC-gen *CMY-2* vaker voor bij landbouwhuisdieren, en *CTX-M-15* bij mensen (Dorado-Garcia et al. 2018, Ewers et al. 2012, Overdevest et al. 2011).

Om te bevestigen dat de ESBL/AmpC-EC isolaten die aangetroffen werden in het oppervlaktewater een dierlijke oorsprong hebben, werd de verdeling van de verschillende ESBL-genen vergeleken met dat van isolaten geïsoleerd uit dierlijke mest in hetzelfde jaar in het kader van een RIVM onderzoek in opdracht van het ministerie van VWS (Schmitt et al. 2019). De mestmonsters waren afkomstig van geanonimiseerde mestverwerkingsbedrijven (waardoor er geen informatie beschikbaar was over de locatie van deze bedrijven t.o.v. de oppervlaktewatermeetpunten). De mestmonsters zijn genomen in de periode van juni tot en met december 2017 en waren afkomstig van melkvee (n=14), vleeskalveren (n=20), varkens (n=20) en kippen (n=26). Voor de isolatie van ESBL- en AmpC-EC isolaten waren dezelfde selectieve kweekmedia (d.w.z. ChromID ESBL en TBX/CTX) en selectieve kweekcondities (d.w.z. 4h 37°C gevolgd door 18-20 uur 44°C) gebruikt als in de huidige studie, wat directe vergelijking mogelijk maakt.

Daarnaast zijn de oppervlaktewater- en mestisolaten vergeleken met ESBL-EC afkomstig uit RWZI effluent. Verondersteld wordt dat, omdat stedelijk rioolwater grotendeels bestaat uit afvalwater uit huishoudens (CBS 2011), effluent isolaten voornamelijk een humane oorsprong

hebben. De effluentisolaten zijn in 2016 geïsoleerd uit effluenten van 100 van de 340 Nederlandse RWZIs, in het kader van een RIVM onderzoek in opdracht van het ministerie van VWS (Schmitt et al. 2017). Bij de isolatie van de effluent isolaten is alleen gebruik gemaakt van ChromID ESBL agar, bij dezelfde kweekcondities als voor het oppervlaktewater en de mest. Om de genenfrequentie uit oppervlaktewater- en mestisolaten te vergelijken met die uit effluent, zijn van de oppervlaktewater en mestisolaten alleen de stammen geïsoleerd op ChromID ESBL agar gebruikt.

E. coli stammen behorend tot phylogroep B2₃ hebben een verhoogde virulentie en komen met name voor bij mensen (White et al. 2011). Bij ESBL-producerende *E. coli* komt het sequence type ST131, welke onderdeel uitmaakt van de B2₃ groep, vaak voor bij klinische isolaten, geassocieerd met CTX-M-15 of CTX-M-27 (Coque et al. 2008, Matsumura et al. 2016, Nicolas-Chanoine et al. 2008, Petty et al. 2014). Om de dierlijke herkomst van ESBL-isolaten uit landelijk oppervlaktewater verder te bevestigen zijn de oppervlaktewater ESBL-EC tenslotte ook nog vergeleken met ESBL-isolaten uit mest en RWZI voor wat betreft het voorkomen van B2₃ en ST131 genotypen.

2.8 Analyses en statistiek

De prevalentie en concentraties van *E. coli* en ESBL/AmpC-EC in oppervlaktewater zijn onderzocht in relatie tot agrarische activiteit en neerslag. Er zijn vijf verschillende parameters gebruikt voor agrarische activiteit: 1) de a priori gebruikte selectiecriteria (d.w.z. aantallen en typen landbouwhuisdierbedrijven en mestgebruik op jaarbasis), 2) dierdichtheid, 3) mestuitrijdseizoen, 4) de uitgereden mest per jaar per oppervlakte, en 5) de jaarlijkse ESBL-EC emissie met mest. Daarnaast is het effect van neerslag onderzocht.

2.8.1 Beschrijving van de variabelen

1. Aantal en typen landbouwhuisdierbedrijven
Meetlocaties zijn ingedeeld gebaseerd op de aantallen en typen landbouwhuisdierbedrijven per gemeente (CBS 2015b), daarmee de indeling volgend op basis waarvan de locaties van te voren waren geselecteerd (zie figuur 2.2-1).
2. Landbouwhuisdierdichtheid.
Hiervoor is voor elke gemeente het aantal landbouwhuisdieren per km² berekend, gebaseerd op CBS gegevens (CBS 2016a, b). Dit is afzonderlijk gedaan voor rundvee, melkvee, vleeskalveren, varkens, kippen, vleeskuikens en leghennen.
3. Mestuitrijdseizoen
Drijfmest mag uitgereden worden van februari tot en met augustus, waarbij er kleine verschillen zijn voor wat betreft de exacte periode afhankelijk van het type grond (zand/löss vs. klei/veen) en de bestemming (grasland vs. bouwland) (RVO 2018a). Op zand- en lössgrond geldt voor vaste mest dezelfde periode. Op klei- en veengrond mag vaste mest tot half september (grasland) of het hele jaar door (bouwland) uitgereden worden. Omdat de in Nederland uitgereden dierlijke mest voornamelijk bestaat uit drijfmest is het mestuitrijdseizoen hier gedefinieerd van februari t/m augustus. Voor de analyse zijn

de monsters ingedeeld in twee groepen: die genomen zijn in de maanden september tot en met januari ('buiten het mestuitrijdseizoen'), en die genomen zijn in de maanden februari tot en met augustus ('mestuitrijdseizoen').

4. Jaarlijkse hoeveelheid uitgereden mest per oppervlakte
Gebruikt zijn de mestgegevens per gemeente uit 2015 (CBS 2015a). De locaties zijn ingedeeld in twee groepen: locaties in gemeenten met hoge (>450 miljoen kg) en in gemeenten met lage hoeveelheden (< 100 miljoen kg) uitgereden mest, daarmee de indeling volgend op basis waarvan de locaties waren geselecteerd (zie figuur 2-2.1). Daarnaast is voor elke gemeente de hoeveelheid uitgereden mest per km² berekend, gebaseerd op CBS mestgegevens uit 2015 en oppervlaktegegevens uit 2016 (CBS 2015a, 2016a).
5. Jaarlijkse ESBL-EC emissie met mest per oppervlakte
Dit is een schatting van de aantallen ESBL/AmpC-EC die jaarlijks met mest op land worden gebracht. Hiervoor zijn ESBL/AmpC-EC concentraties in mest gebruikt, gebaseerd op metingen gedaan in 2016 en 2017 ten behoeve van ander RIVM onderzoek (Schmitt et al. 2019). De totale op land gebrachte hoeveelheden ESBL/AmpC-EC zijn berekend door de gemiddelde concentraties ESBL/AmpC-EC in mest te vermenigvuldigen met de in 2015 hoeveelheden uitgereden mest per gemeente (CBS 2015a). Dit is gedaan voor 4 mestgroepen afzonderlijk: rundvee, vleeskalveren, pluimvee en varkens. Vervolgens is de totale emissie per km² landoppervlak berekend, door de hoeveelheid op land gebrachte ESBL-/AmpC-EC in een gemeente te delen door het totale grondoppervlak van die gemeente (CBS 2016a).
6. Neerslag
Voor elke meetlocatie is het dichtstbijzijnde neerslagstation gezocht met behulp van www.neerslagkaart.nl en de dagwaarden van deze neerslagstations gedownload van <https://www.knmi.nl/nederland-nu/klimatologie/monv/reeksen>. Voor de analyses zijn de dagwaarden van de dag voorafgaand aan de monsternamen gebruikt. Dat wil zeggen, de hoeveelheid neerslag die gevallen is tussen 8:00 's ochtends op de dag vóór de monsternamen tot 8:00 's ochtends op de dag van monsternamen. Neerslag in de vorm van sneeuw is buiten beschouwing gelaten. Monsters zijn ingedeeld in groepen gebaseerd op de hoeveelheid neerslag voorafgaand aan de dag van monsternamen: 0-5 mm, 5-10 mm en >10mm.

2.8.2 *Univariate analyses*

Met behulp van univariate analyses is het effect van de zes verschillende variabelen op bacterieconcentraties individueel getest. In de univariate analyses is het effect van de op jaarbasis gedefinieerde agrarische parameters (nrs. 1, 2, 4 en 5 in paragraaf 2.8.1) onderzocht in relatie tot jaargemiddelde *E. coli* en ESBL/AmpC-EC concentraties op de locaties (n=51). Bij deze analyse is voor de negatieve monsters 'nul' als waarde gebruikt en het gemiddelde berekend uit de lineaire waarden. Door de lineaire waarden te gebruiken wegen de negatieve monsters mee in het gemiddelde en reflecteert het jaargemiddelde zowel de frequentie waarmee er ESBL/AmpC-EC op een locatie worden aangetroffen alsook de concentraties in positieve monsters. Het effect

van tijdsafhankelijke parameters (mestuitrijdseizoen en neerslag) is onderzocht in relatie tot individuele metingen (n=586). Hiervoor zijn de log-getransformeerde bacterieconcentraties gebruikt, vanwege de grote spreiding in bacterieconcentraties tussen watermonsters. Voor vergelijkingen van jaargemiddelden zijn non-parametrische tests gebruikt (Mann-Whitney U test, Spearman rangcorrelatie), voor vergelijken van individuele (log-getransformeerde) bacterieconcentraties zijn parametrische tests gebruikt (Student's T-test, ANOVA). Voor het vergelijken van groepen wat betreft percentages ESBL-/AmpC-EC positieve monsters is de Chi-kwadraat test gebruikt. Statistische analyses zijn uitgevoerd met IBM SPSS Statistics Versie 24.

2.8.3 *Multivariate analyses*

Hoe de verschillende variabelen de concentratie *E. coli* en ESBL/AmpC-EC in oppervlaktewater verklaren is onderzocht in een lineair gemengd effect model, met behulp van R, version 3.5.2 (R core team 2018) en lmerTest (Kuznetsova et al. 2017). Als vaste effecten werden melkveedichtheid, kalverendichtheid, varkensdichtheid, leghennendichtheid, vleeskuikendichtheid, mestuitrijdseizoen, hoeveelheid uitgereden mest per km², en neerslag meegenomen. Als random effect werd locatie meegenomen. De afhankelijke variabelen *E. coli* en ESBL/AmpC-concentratie zijn voor de analyses log-getransformeerd. Met behulp van de step-functie werd het beste model geselecteerd (dat wil zeggen het model met de laagste AIC-waarde). Voor de dierdichtheden zijn gewogen waarden aan het model toegevoegd, dat wil zeggen per diersoort de dichtheid gedeeld door de gemiddelde dichtheid van die diersoort. De gemiddelde dierdichtheden voor deze diertypen waren per km²: $1,0 \times 10^2$ voor melkvee, $0,59 \times 10^2$ voor kalveren, $8,6 \times 10^2$ voor varkens, $2,6 \times 10^3$ voor leghennen, en $2,8 \times 10^3$ voor vleeskuikens. Neerslag is geanalyseerd als continue factor, in mm neerslag, en als categorische factor waarbij de monsters zijn onderverdeeld in drie categorieën: 0-5 mm (referentiegroep), 5-10 mm en > 10 mm. Voor het mestuitrijdseizoen zijn twee verschillende definities van de variabele vergeleken: een waarbij september buiten het mestuitrijdseizoen valt (zoals gebruikt voor de univariate analyse), en een waarbij september binnen het mestuitrijdseizoen valt.

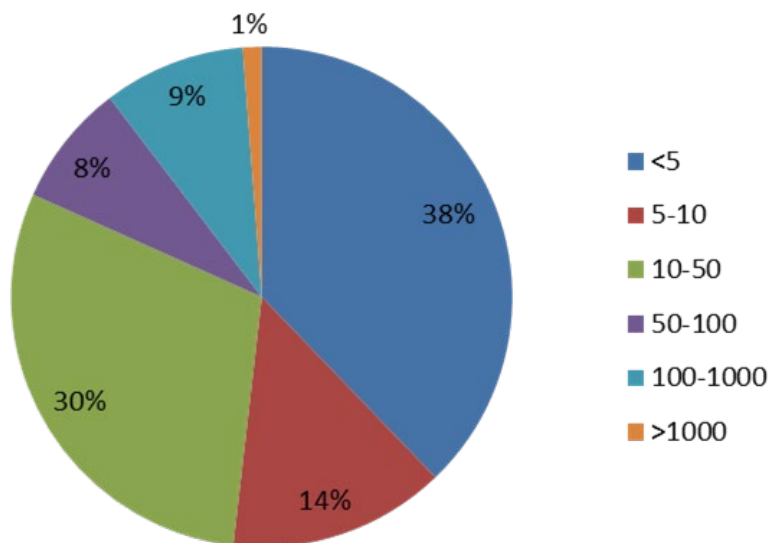
Omdat melkveedichtheden zeer sterk correleerden met de uitgereden hoeveelheid mest per km² konden deze twee variabelen niet tegelijkertijd in één model getest worden. Er is daarom gekozen voor twee afzonderlijke analyses met de volgende variabelen: 1) melkveedichtheid, kalverendichtheid, varkensdichtheid, leghennendichtheid, vleeskuikendichtheid, mestuitrijdseizoen (variant 1 en 2), neerslag (mm of categorie) en locatie, en 2) dierdichtheid (d.w.z. de som van alle afzonderlijke gewogen dierdichtheden), mestuitrijdseizoen (variant 1 en 2), hoeveelheid uitgereden mest per km², neerslag (mm of categorie) en locatie.

3 Resultaten

3.1 Prevalentie en concentraties ESBL/AmpC-EC in landbouw specifiek oppervlaktewater

In totaal werden 586 oppervlaktewater monsters genomen op 51 locaties. Gebruikmakend van twee verschillende specifieke media werd in 164 van de monsters (28%) ESBL-EC en/of AmpC-EC aangetroffen. ESBL-EC werden vaker aangetroffen dan AmpC-EC: in respectievelijk 155 (26%) vs. 23 (3,9%) van de monsters; in 14 (2,4%) van de monsters werden beide typen aangetroffen.

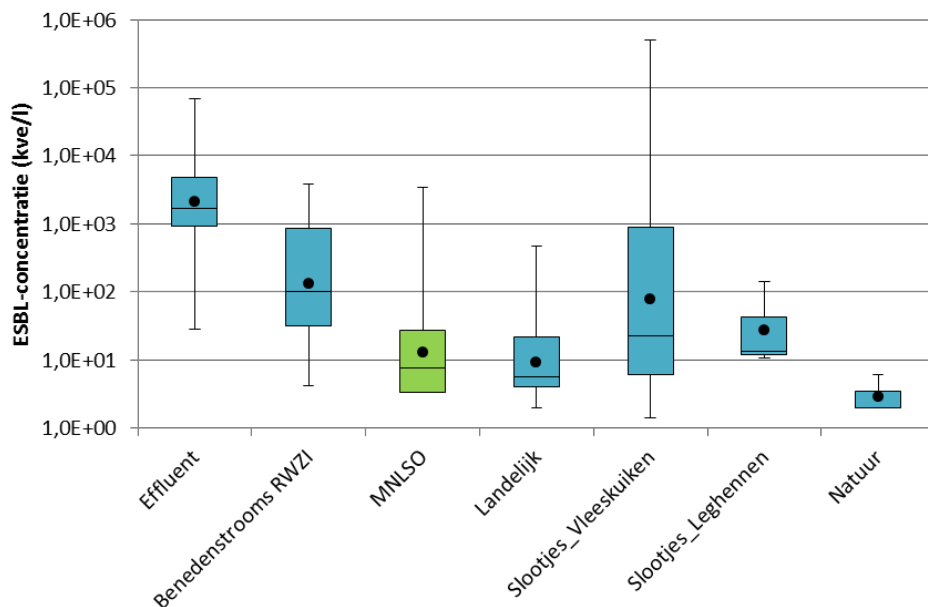
In positieve monsters varieerden de totale concentraties van ESBL-EC en AmpC-EC (ESBL/AmpC-EC) van 3,3 kve/l (de detectielimiet van de methode) tot $4,8 \times 10^3$ kve/l (geometrisch gemiddelde 12 kve/l, mediaan 6,7 kve/l). Ruim één-derde van de positieve monsters (38%) had een concentratie van minder dan 5 kve/l, terwijl in slechts 10% van de positieve monsters relatief hoge concentraties werden gevonden van ≥ 100 kve/l (figuur 3.3-1). In bijlage 6.3 is voor elk meetpunt afzonderlijk weergegeven hoe vaak ESBL/AmpC-EC werden gevonden en in welke concentraties. Op vier van de 51 locaties (7,8%) werd gedurende het gehele jaar geen enkele keer ESBL/AmpC-EC aangetroffen. Waarden van ≥ 100 kve/l werden op 12 (23,5%) van de locaties gevonden en dan meestal slechts één keer gedurende het meetjaar. Op slechts drie van de locaties werden dergelijke hoge concentraties vaker dan eens aangetroffen. Tussen locaties varieerden de jaargemiddelde ESBL/AmpC-EC concentraties van 0,28 kve/l tot 400 kve/l (gemiddeld 23 kve/l, mediaan 2,8 kve/l; bijlage 6.4).



Figuur 3.1-1. Verdeling van de ESBL/AmpC-EC concentraties in positieve oppervlaktewatermonsters. Weergegeven is het percentage monsters met een concentratie in de aangegeven categorieën uitgedrukt als percentage van het totale aantal positieve monsters (n=164).

In eerder RIVM onderzoek werden ESBL-EC concentraties bepaald in ander Nederlands oppervlaktewater en in afvalwater (zie tabel 2.4-1). In die studies waren AmpC-EC niet in de analyse meegenomen en was de ESBL-EC concentratie alleen bepaald door gebruik van ChromID ESBL agar. Om het vóórkomen van ESBL-EC in het landbouw specifiek oppervlaktewater te vergelijken met deze eerder onderzochte wateren, zijn de ESBL-EC concentraties ook apart berekend (d.w.z. exclusief AmpC-EC) én gebaseerd op alleen de uitkomst op ChromID ESBL agar (formule ii in paragraaf 2.4.3.). De ESBL-EC concentratie in het landbouw specifiek oppervlaktewater was in dezelfde orde van grootte van wat eerder gevonden was in oppervlaktewater in landelijk gebied (geometrisch gemiddelde: 13 vs. 9,3 kve/l en mediaan 7,7 vs. 5,7 kve/l; figuur 3.1-2). Deze concentraties waren lager dan wat eerder werd gevonden in slootjes aangrenzend aan kippenbedrijven (geometrisch gemiddelde 66 kve/l, mediaan 19 kve/l) en oppervlaktewater benedenstrooms van RWZIs (geometrisch gemiddelde 130 kve/l, mediaan 101 kve/l). In monsters genomen in een natuurgebied was de concentratie juist iets lager dan gevonden in agrarisch gebied (geometrisch gemiddelde 2,9 kve/l, mediaan 2,0 kve/l).

Het percentage ESBL-EC positieve monsters (gebaseerd op alleen ChromID ESBL agar) was 19%, wat relatief laag was vergeleken met de prevalenties die eerder waren gevonden in landelijk gebied (41%), in een natuurgebied (50%), slootjes aangrenzend aan kippenbedrijven (69%) en water onder invloed van RWZIs (100%).



Figuur 3.1-2. ESBL-concentraties in de "MNLSO" meetlocaties vergeleken met eerder onderzochte locaties. De boxen geven de mediaan (horizontale lijn) weer met het 25- en 75-percentiel (onder- en bovenkant box). De errorbars geven de minimale en maximale waarden weer, de zwarte cirkels de gemiddelden. Voor de MNLSO-locaties zijn voor deze figuur alleen de resultaten op ChromID ESBL agar gebruikt.

3.2 ESBL/AmpC-EC waterconcentraties in relatie tot agrarische activiteit

3.2.1 Aantal en typen landbouwhuisdierbedrijven

In de monsters genomen op meetlocaties in gemeenten met een hoog aantal LBH bedrijven werden niet vaker ESBL/AmpC-EC aangetroffen dan in monsters genomen in gemeenten met een laag aantal LBH bedrijven (tabel 3.2-1). Wel werd in gemeenten waar kippenbedrijven een relatief groot aandeel vormden ESBL/AmpC-EC vaker aangetroffen (37% vergeleken met 26%; $p=0,02$, Chi-kwadraat test). Dit was niet het geval voor gemeenten waar relatief veel kalveren- of varkensbedrijven waren. Voor de kalverenbedrijven moet hier echter wel de kanttekening worden gemaakt dat er slechts vier meetlocaties gedefinieerd waren als 'met relatief hoog percentage kalverenbedrijven', waardoor de statistische kracht van deze test mogelijk te laag is voor een betrouwbare uitspraak; het percentage positieve monsters was op deze vier plekken met 36% wel iets hoger vergeleken met dat op de overige locaties.

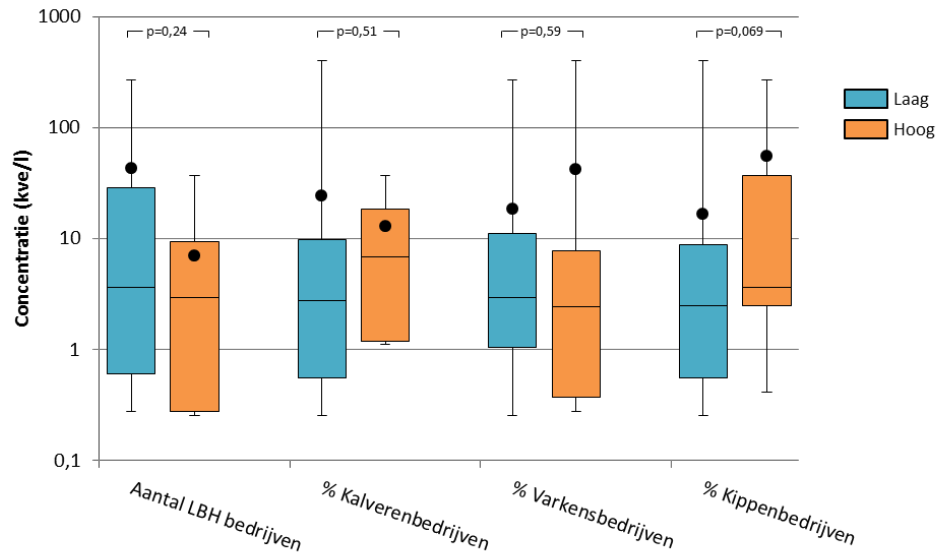
Tabel 3.2-1. Aantallen en percentages ESBL/AmpC-EC-positieve monsters naar type gemeente.

	Aantal locaties	Aantal monsters	Aantal positief	% positief
Aantal bedrijven > 200	20	237	60	25
Aantal bedrijven < 50	13	150	44	29 ^{ns}
% Kippenbedrijven_hoog ^a	9	99	37	37*
Overige gemeenten	42	360	127	26
% Kalverenbedrijven_hoog ^a	4	47	17	36 ^{ns}
Overige gemeenten	47	539	147	27
% Varkensbedrijven_hoog ^a	11	118	30	25 ^{ns}
Overige gemeenten	40	468	134	29
Totaal	51	586	164	28

^aEen relatief hoog percentage bedrijven was a priori gedefinieerd en voor kippenbedrijven, kalveren- en varkensbedrijven respectievelijk: $\geq 15\%$, $\geq 25\%$ en $\geq 30\%$ van alle LBH-bedrijven (zie tabel 2.2-1); 'overige gemeenten' is gedefinieerd als de gemeenten anders dan de gemeenten met het relatief hoge percentage kippen-, kalveren- of varkensbedrijven, en bestaat dus in elke vergelijking uit een andere set. * $P=0,02$, Chi-kwadraat-test, ns=niet statistisch significant.

Ook waren de jaargemiddelde ESBL/AmpC-EC concentraties in gemeenten met veel landbouwhuisdierbedrijven niet verhoogd ten opzichte van gemeenten met weinig landbouwhuisdierbedrijven (gemiddeld resp. 6,9 vs. 4,3 kve/l, mediaan 3,6 vs. 2,9 kve/l, figuur 3.2-1). In gemeenten met het hoogste aandeel kippenbedrijven waren de jaargemiddelde ESBL/AmpC concentraties licht verhoogd t.o.v. de overige gemeenten (gemiddeld resp. 55 vs. 17 kve/l, mediaan 3,6 vs. 2,5 kve/l, figuur 3.2-1). Dit verschil was niet statistisch significant, maar de lage p-waarde ($p=0,069$) kan betekenen dat er een zwak effect van kippenbedrijven is op de jaargemiddelde oppervlaktewaterconcentraties.

3.2.2 Uitrijden van mest

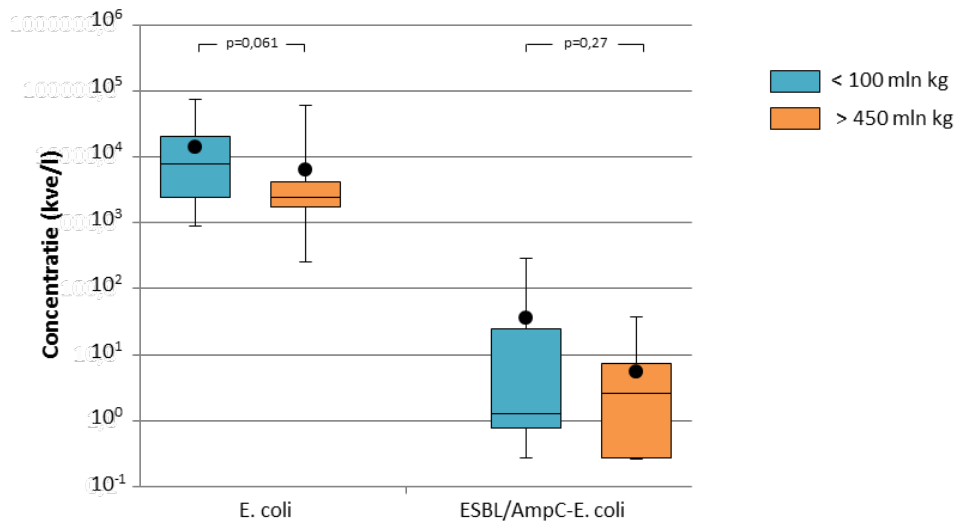


Figuur 3.2-1. Jaargemiddelde ESBL/AmpC-EC concentraties in relatie tot agrarische activiteit en typen bedrijven. De boxen geven de mediane waarden (horizontale lijn) en het 25- en 75-percentiel (onder- en bovenkant van de box) van de jaargemiddelden weer. De errorbars geven de minimale en maximale waarden aan, en de ronde symbolen het gemiddelde. Voor de verschillende groepen is "hoog" en "laag" gedefinieerd zoals beschreven in tabel 2.2-1. De p-waarden zijn berekend met de Mann-Whitney U test.

In de gemeenten waar relatief veel mest werd uitgereden waren de jaargemiddelde ESBL/AmpC-EC concentraties niet hoger dan in gemeenten waar relatief weinig mest werd uitgereden (gemiddeld resp. 5,4 vs. 36 kve/l, mediaan 2,6 vs. 1,3, figuur 3.2-2). Voor totale *E. coli* waren de jaargemiddelden zelfs eerder iets verlaagd in de gemeenten waar relatief veel mest wordt uitgereden (mediaan $2,4 \times 10^3$ vs. $7,8 \times 10^3$, figuur 3.2-2). Ook was het percentage ESBL/AmpC-EC positieve monsters niet hoger in de gemeenten waar relatief veel mest werd uitgereden vergeleken met de gemeenten waar relatief weinig mest werd uitgereden (24% vs. 29%, $p=0,29$, Chi-kwadraat test).

De uitkomst van deze analyse werd bevestigd (en voor *E. coli* zelfs versterkt) wanneer de correlatie tussen jaargemiddelde bacterieconcentraties in water en hoeveelheden uitgereden mest per jaar werd getoetst in een Spearman rangcorrelatie test (ESBL/AmpC-EC: $r_s=-0,164$, $p=0,25$; *E. coli*: $r_s=-0,328$, $p=0,019$; resultaten niet weergegeven in een figuur). Ook wanneer de uitgereden hoeveelheid mest werd uitgedrukt per oppervlakte (km^2) was er geen correlatie tussen ESBL/AmpC-EC en uitgereden mest, en een zwakke negatieve associatie tussen totale *E. coli* en de hoeveelheden uitgereden mest (ESBL/AmpC-EC: $r_s=-0,175$, $p=0,22$; *E. coli*: $r_s=-0,257$, $p=0,068$).

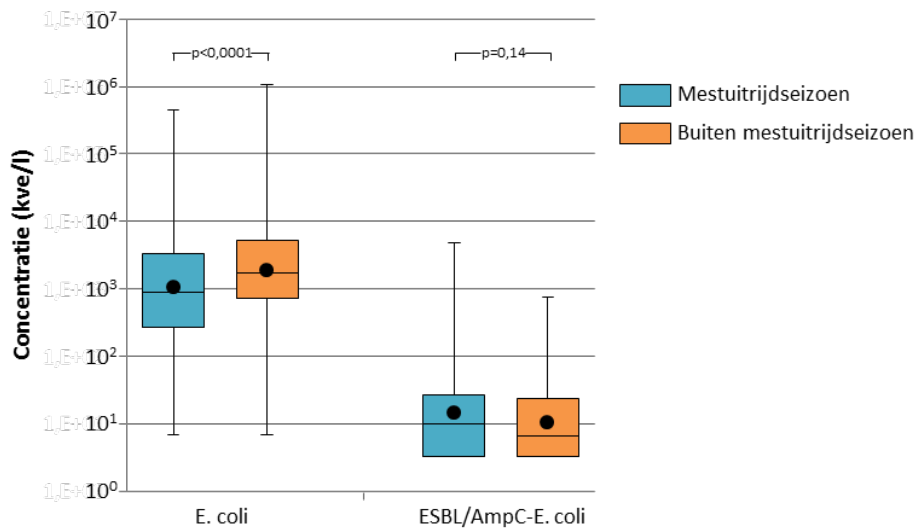
In overeenstemming met het afwezig zijn van een duidelijke associatie tussen de hoeveelheid gebruikte mest op gemeenteniveau en de prevalentie van ESBL/AmpC-EC in het oppervlaktewater, werd in monsters genomen tijdens het mestuitrijdseizoen *minder* vaak



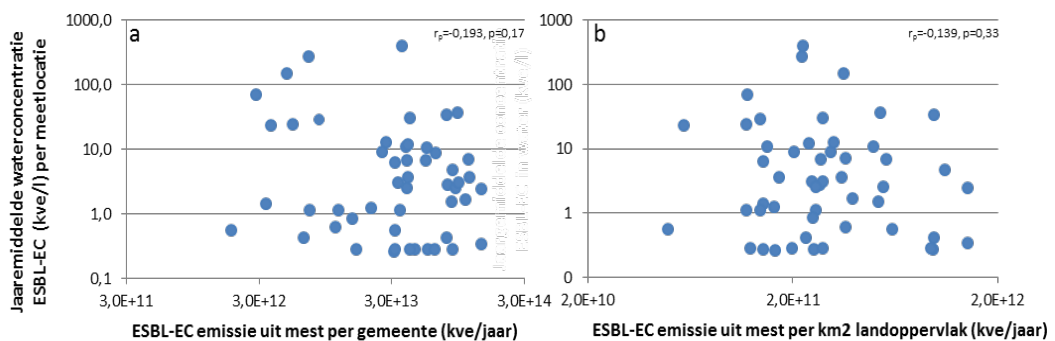
Figuur 3.2-2. Jaargemiddelde concentraties *E. coli* en ESBL/AmpC in gemeenten met relatief hoog of laag mestgebruik. De boxen geven de mediane waarden (horizontale lijn) en het 25- en 75-percentiel (onder- en bovenkant van de box) van de jaargemiddelden weer. De errorbars geven de minimale en maximale waarden aan, de ronde symbolen het geometrische gemiddelde. De *p*-waarden zijn berekend met de Mann-Whitney U test.

ESBL/AmpC-EC aangetroffen dan daarbuiten (22% vs. 36%, $p < 0,0001$, Chi-kwadraat test). Ook waren de ESBL/AmpC-EC concentraties in de positieve monsters binnen en buiten het mestuitrijdseizoen vergelijkbaar (geometrisch gemiddelde 15 vs. 10 kve/l, mediaan 10 vs. 6,7 kve/l, figuur 3.2-3), en waren totale *E. coli* concentraties tijdens het mestuitrijdseizoen verlaagd (mediaan $9,1 \times 10^2$ vs. $1,7 \times 10^3$, figuur 3.2-3). Ook als alleen monsters uit gemeenten met relatief hoog mestgebruik werden meegerekend, was de concentratie ESBL/AmpC-EC binnen het mestuitrijdseizoen niet hoger dan daarbuiten, en was de totale *E. coli* concentratie juist lager binnen het mestuitrijdseizoen (ESBL/AmpC-EC: mediaan 8,2 kve/l vs. 6,7 kve/l, $p = 0,82$ en *E. coli*: mediaan $7,7 \times 10^2$ vs. $1,7 \times 10^3$, $p = 0,005$, T-test).

De mest die op land gebracht wordt bestaat grotendeels uit mest van rundvee en varkens (Schmitt et al. 2017). In welke verhouding verschillende typen mest worden gebruikt verschilt per regio. Verschillende typen mest verschillen in de prevalentie en concentraties van ESBL/AmpC-EC (Schmitt et al. 2019). Gebaseerd op het gebruik van verschillende typen mest per gemeente en de concentraties ESBL/AmpC-EC in mesttypen, zijn de geschatte aantallen ESBL/AmpC-EC die per jaar met mest op land gebracht worden in de orde van grootte van 10^{12} tot 10^{14} per gemeente, of 10^{10} tot 10^{11} per km² (figuur 3.2-4). De jaargemiddelde ESBL/AmpC-EC concentraties in het water correleerden niet met de hoeveelheden ESBL/AmpC-EC die naar schatting in dezelfde gemeenten met mest op land werden gebracht (figuur 3.2-4).



Figuur 3.2-3. Concentraties *E. coli* en ESBL/AmpC tijdens het mestuitrijdseizoen en daarbuiten. De boxen geven de mediane waarden (horizontale lijn) en het 25- en 75-percentiel (onder- en bovenkant van de box) weer. De errorbars geven de minimale en maximale waarden aan, de ronde symbolen het geometrische gemiddelde. De *p*-waarden zijn berekend met de *T*-test op de log-getransformeerde waarden.

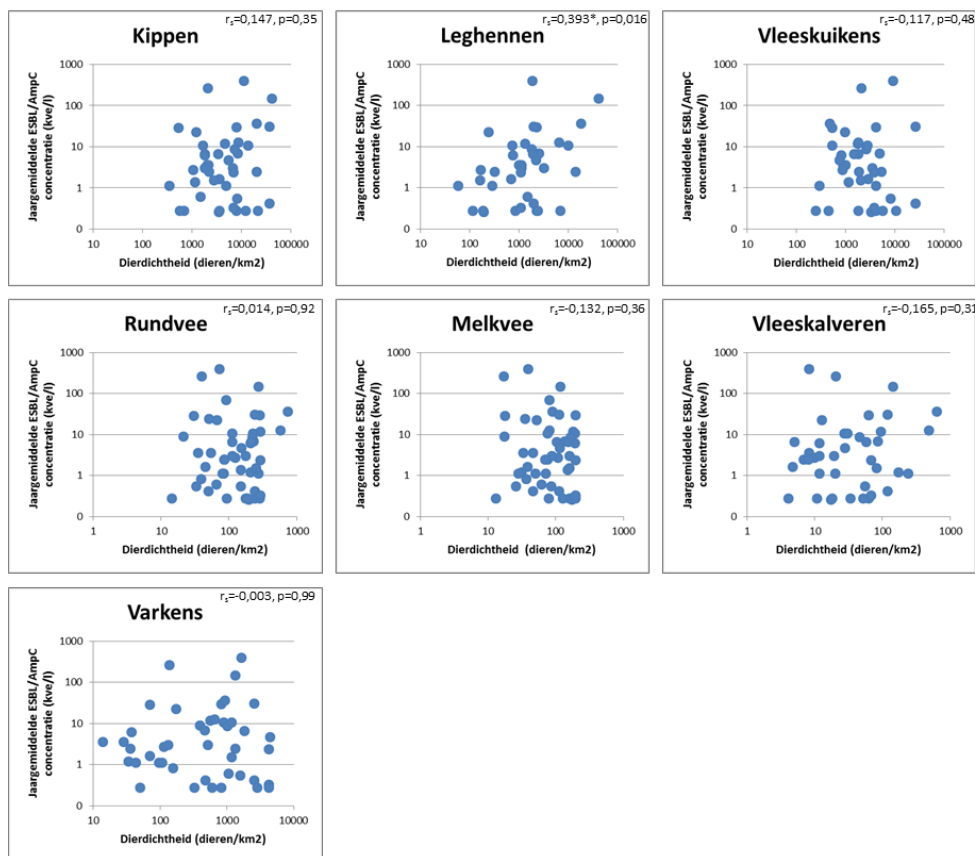


Figuur 3.2-4. Correlatie tussen de ESBL/AmpC-EC concentratie in water en de emissie met mest. De emissie is berekend als het aantal ESBL-EC per gemeente per jaar (a) en per km² landoppervlak per jaar (b). r_p =Pearson's correlatiecoëfficiënt.

3.2.3 Aantallen landbouwhuisdieren per km²

Er werden geen statistisch significante correlaties gevonden tussen dierdichtheden en *E. coli* of ESBL/AmpC-EC concentraties in het oppervlaktewater. Echter, wanneer gemeenten waar de onderzochte diertypen niet of alleen in zeer lage aantallen voorkwamen (d.w.z. met 0-1 vleeskalveren/km² en 0-2 varkens of kippen per km²) werden geëxcludeerd, bleken de jaargemiddelde ESBL/AmpC-EC concentraties in water gecorreleerd met leghennendichtheid ($r_s=0,393$, $p=0,02$; figuur 3-2.5). Op dezelfde manier geanalyseerd waren de jaargemiddelde *E. coli* concentraties in water gecorreleerd met leghennen- en kalverendichtheid ($r_s=0,340$, $p=0,039$ voor leghennendichtheid en

$r_s=0,457$, $p=0,003$ voor kalverendichtheid, niet in een figuur weergegeven).



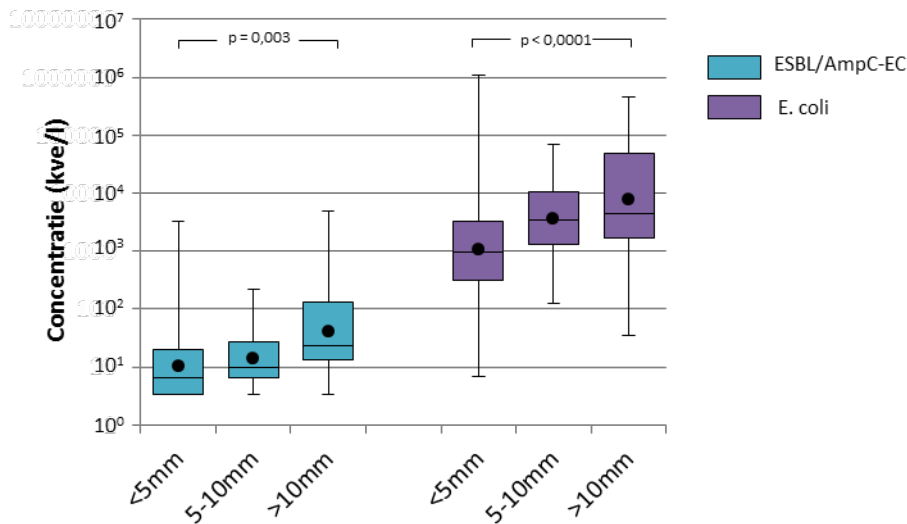
Figuur 3.2-5. Correlaties tussen dierdichtheden per gemeente en ESBL-/AmpC concentraties (jaargemiddelde) in oppervlaktewater. In elke figuur is de correlatiecoëfficiënt (Pearson's correlatiecoëfficiënt of r_p) en de p -waarde weergegeven.

In een lineair gemengd effectmodel, waarbij naast melkvee-, kalveren-, varkens-, leghennen- en vleeskuikendichtheden ook neerslag en mestuitrijdseizoen (allen vaste effecten) en locatie (random effect) waren toegevoegd, waren leghennendichtheid en kalverendichtheid significante factoren voor respectievelijk ESBL/AmpC-EC en *E. coli* concentraties in water (zie tabel 3-5.1).

3.3 Effect neerslag op ESBL/AmpC-EC in landbouw-specifiek oppervlaktewater

Bij 500 (85%) van de oppervlaktewatermonsters was het gedurende het etmaal voor de monsternamendag droog (0 mm neerslag) of viel er een geringe hoeveelheid neerslag (tot 5 mm neerslag). In 26 (4,4%) gevallen was er voorafgaand aan de monsternamedag meer dan 10 mm neerslag gevallen. Bij de overige monsternames viel de neerslag daar tussen in (5-10mm). Het percentage ESBL/AmpC-positieve monsters was statistisch significant lager op de relatief droge dagen (0-5 mm) vergeleken met nattere dagen: 24% vergeleken met 48% en 54% op dagen met respectievelijk 5-10 mm en >10 mm neerslag ($p<0,0001$,

Chi Kwadraat test). Tevens waren zowel de concentraties *E. coli* als ESBL/AmpC-EC in de positieve monsters hoger op de dagen met veel neerslag (mediane waarden bij <5 mm, 1-5 mm en >10 mm



Figuur 3.3-1. Concentraties *E. coli* en ESBL/AmpC in relatie tot neerslag. De boxen geven de mediane waarden (horizontale lijn) en het 25- en 75-percentiel (onder- en bovenkant van de box) weer. De errorbars geven de minimale en maximale waarden aan, en de ronde symbolen het geometrische gemiddelde. De *p*-waarden zijn berekend met de ANOVA op de log-getransformeerde waarden.

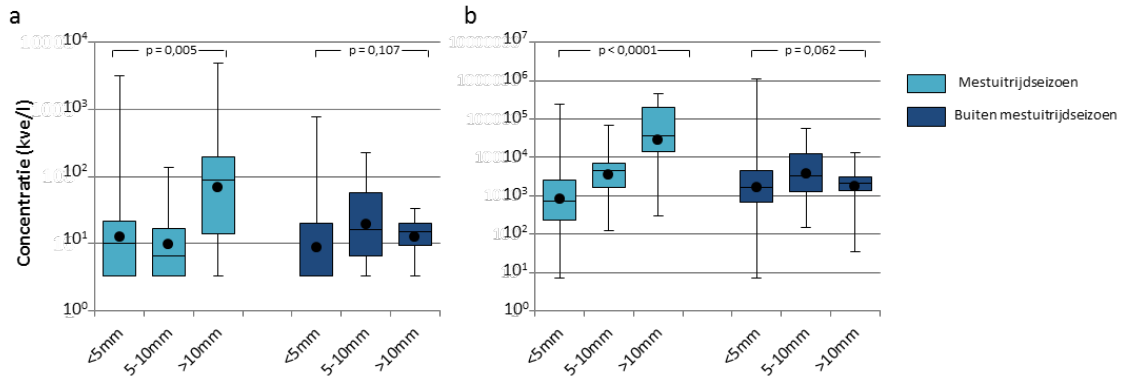
respectievelijk voor *E. coli*: $9,8 \times 10^2$, $3,5 \times 10^3$ en $4,3 \times 10^3$ kve/l, voor ESBL/AmpC-EC: 6,7, 10 en 24 kve/l; figuur 3-3.1).

Tijdens het mestuitrijdseizoen was het effect van de hoeveelheid neerslag groter dan daarbuiten. Vooral bij meer dan 10 mm neerslag voorafgaand aan de monsternamedag was een hoog percentage van de monsters positief voor ESBL/AmpC-EC: 71% vergeleken met 18% en 43% van de monsters bij respectievelijk 0-5 mm en 5-10 mm neerslag ($p > 0,0001$, Chi-kwadraat test). Buiten het mestuitrijdseizoen was 33% van de monsters positief op dagen volgend op meer dan 10 mm neerslag, vergeleken met 34 en 53% bij respectievelijk <5 mm en 5-10 mm ($p = 0,12$; Chi-kwadraat test). In de positieve monsters waren ook de concentraties ESBL/AmpC-EC en totale *E. coli* duidelijk verhoogd op dagen voorafgegaan door veel neerslag (mediane waarden bij <5 mm, 1-5 mm en >10 mm respectievelijk voor *E. coli*: $7,1 \times 10^2$, $4,5 \times 10^3$ en $3,5 \times 10^4$ kve/l, voor ESBL/AmpC-EC: 10, 6,7 en 87 kve/l; figuur 3-3.2).

Samenvattend waren de concentraties ESBL/AmpC-EC in oppervlaktewater het hoogst bij hevige neerslag tijdens het mestuitrijdseizoen, en het laagste bij geen of geringe neerslag buiten het mestuitrijdseizoen.

Ook in een lineair gemengd effectmodel, waarbij naast neerslag ook de afzonderlijke dierdichtheden en het mestuitrijdseizoen (vaste effecten) en locatie (random effect) waren toegevoegd, was neerslag een

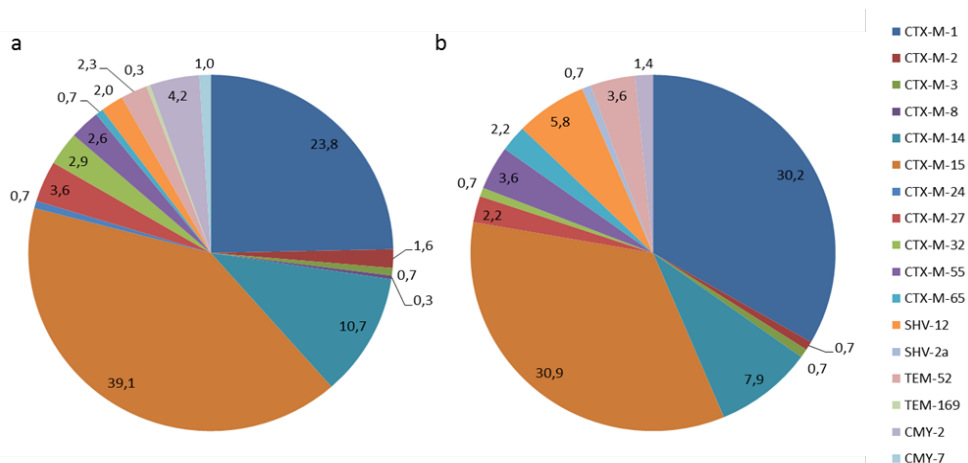
significant voorspellende factor voor zowel ESBL/AmpC-EC en *E. coli* concentraties in water (zie tabel 3-5.1).



Figuur 3.3-2. Bacterieconcentraties tijdens het mestuitrijdseizoen en daarbuiten in relatie tot neerslag. Concentraties zijn weergegeven van ESBL/AmpC-EC (a) en totale *E. coli* (b). De boxen geven de mediane waarden (horizontale lijn) en het 25- en 75-percentiel (onder- en bovenkant van de box) weer. De errorbars geven de minimale en maximale waarden aan, en de ronde symbolen het geometrische gemiddelde. De p-waarden zijn berekend met de ANOVA test op de log-getransformeerde waarden (wanneer alleen de groepen "<5 mm" en ">10 mm" worden vergeleken zijn de p-waarden tijdens en buiten het mestuitrijdseizoen respectievelijk $p=0,049$ en $p=0,60$ voor ESBL/AmpC-EC en $p<0,0001$ en $p=0,97$ voor *E. coli*, T-test).

3.4 ESBL/AmpC-EC typen in landbouw-specifiek oppervlaktewater

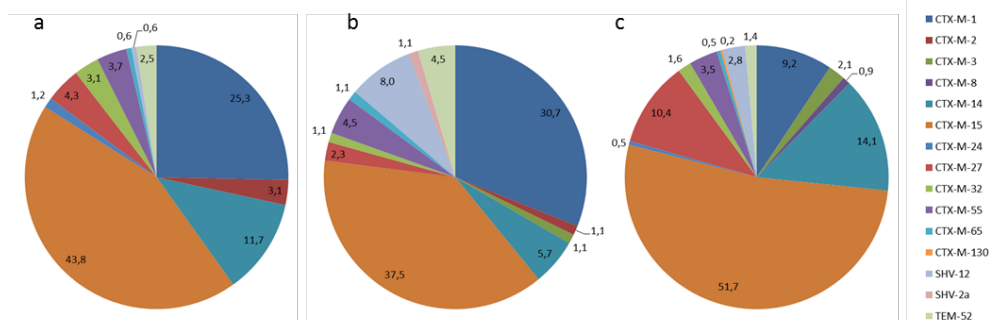
De verdeling van ESBL- en AmpC-EC genen die bij oppervlaktewater isolaten werden aangetroffen was zeer vergelijkbaar met dat bij mest-isolaten ($p=0,149$, Chi-kwadraat-test)(figuur 3.4-1).



Figuur 3.4-1. Verdeling ESBL en AmpC-genen in ESBL- en AmpC-isolaten uit agrarisch oppervlaktewater (a) en mest (b). Het aantal isolaten was voor a en b respectievelijk 307 en 139.

De vergelijkbare verdeling van ESBL- en AmpC genen maken het aannemelijk dat de ESBL- en AmpC-EC in het landelijk oppervlaktewater grotendeels een dierlijke oorsprong hebben. Dit wordt bevestigd door

ESBL-EC uit water en mest te vergelijken met ESBL-EC uit RWZI effluenten (figuur 3.4-2). Hoewel de verschillen tussen de op ChromID ESBL agar geïsoleerde ESBL-EC isolaten uit oppervlaktewater- en mest iets groter waren dan wanneer de ESBL- en AmpC isolaten van beide media mee werden genomen (oppervlaktewater vs. mest: $p=0,045$, Chi-kwadraat test), was de discrepantie met de effluent isolaten duidelijk



Figuur 3.4-2. Verdeling ESBL-genen in ESBL-isolaten uit agrarisch oppervlaktewater (a), mest (b) en RWZI effluent (c). Alle isolaten waren afkomstig van ChromID ESBL agar. Het aantal isolaten gebruikt voor de analyse was voor a, b, en c respectievelijk 162, 88, en 433.

nog groter (oppervlaktewater vs. effluent: $p<0,0001$, Chi-kwadraat test). Met name de frequenties in CTX-M-1 (25% vs. 9,2%, $p<0,0001$), CTX-M-27 (4,3% vs. 10%, $p=0,020$) en CTX-M-15 (44% vs. 52%, $p=0,08$) waren in oppervlaktewaterisolaten afwijkend t.o.v. effluentisolaten.

De prevalentie van ST131 isolaten was onder ESBL-EC isolaten uit oppervlaktewater 8,6%. Dit was iets, maar niet statistisch significant, hoger dan in mest (3,4%, $p=0,12$), en statistisch significant lager dan in RWZI effluent (21%, $p=0,0006$).

3.5 Lineair gemengd effect model

Er zijn twee verschillende modellen getest wat betreft geïncorporeerde variabelen; 1) de dierdichtheden voor melkvee, kalveren, varkens, leghennen en vleeskuikens, neerslag, mestuitrijdseizoen en 2): de totale dierdichtheid, neerslag, mestuitrijdseizoen en uitgereden mest per km^2 . Aan beide modellen was locatie toegevoegd als random effect (tabel 3.5-1). Leghennendichtheid en neerslag waren voorspellende factoren voor ESBL/AmpC-concentraties in oppervlaktewater. In tegenstelling tot *E. coli* was het mestuitrijdseizoen geen significante factor voor ESBL/AmpC-EC concentraties. Echter, in overeenstemming met de univariate analyse was de *E. coli* concentratie juist hoger buiten het mestuitrijdseizoen (namelijk 0,0475 log, oftewel een factor 1,6 hoger) dan binnen het mestuitrijdseizoen. Daarnaast waren kalverendichtheid en neerslag voorspellende factoren voor *E. coli* concentraties. In geen van de modellen was de hoeveelheid uitgereden mest een significante factor. De uitkomsten waren vergelijkbaar wanneer september bij het mestuitrijdseizoen werd gerekend en wanneer voor neerslag categorieën werden gebruikt in de analyses.

Tabel 3.5-1. Lineair gemengd effect modellen voor ESBL/AmpC-EC en *E. coli* concentraties in oppervlaktewater.

	β^a	Std. err	t	p-waarde
Model 1 (vaste effecten: neerslag, mestuitrijdseizoen^b, dierdichtheid per diersoort^c)				
<i>ESBL/AmpC-EC</i>				
Intercept (C_0)	2,148	0,145	14,779	<0,0001
Neerslag (mm/24uur)	0,067	0,022	3,116	0,002
Relatieve leghennendichtheid (aantal dieren/km ²)	0,080	0,038	2,116	0,044
<i>E. coli</i>				
Intercept (C_0)	6,515	0,181	35,918	<0,0001
Buiten mestuitrijdseizoen	0,475	0,122	3,889	0,0001
Neerslag (mm/24uur)	0,124	0,015	8,101	<0,0001
Relatieve kalverendichtheid (aantal dieren/km ²)	0,219	0,079	2,766	0,007
Model 2 (vaste effecten: neerslag, mestuitrijdseizoen, uitgereden mest^d, dierdichtheid totaal^e)				
<i>ESBL/AmpC-EC</i>				
Intercept (C_0)	2,230	0,141	15,786	P<0,0001
Neerslag (mm/24uur)	0,074	0,022	3,456	P=0,0007
<i>E. coli</i>				
Intercept (C_0)	6,731	0,174	38,617	<0,0001
Buiten mestuitrijdseizoen	0,474	0,122	3,880	0,0001
Neerslag (mm/24uur)	0,126	0,015	8,194	<0,0001

^aDe coëfficiënt β geeft de toename weer in log bacterieconcentratie (lnC) in relatie tot toename van de variabelen: $\ln C = C_0 + \beta_1 \times \text{variabele1} + \beta_2 \times \text{variabele2} + \dots + \beta_n \times \text{variabele}^n$, waaruit volgt dat $C = \exp(C_0 + \beta_1 \times \text{variabele1} + \beta_2 \times \text{variabele2} + \dots + \beta_n \times \text{variabele}^n)$. ^bMestuitrijdseizoen is hier gedefinieerd als februari t/m augustus; de weergegeven coëfficiënt β geldt voor de situatie "buiten het mestuitrijdseizoen", "binnen het mestuitrijdseizoen is de coëfficiënt nul. ^cGebruikt is de relatieve dierdichtheid, d.w.z. de dierdichtheid gedeeld door de gemiddelde dierdichtheid, geïnccludeerde dierdichtheden zijn melkvee-, kalveren-, varkens-, leghennen- en vleeskuikendichtheid. De coëfficiënt β geeft daarmee de toename in concentratie weer voor elke toename met het gemiddelde aantal dieren per km². ^dUitgereden mest is uitgedrukt in miljoen kilogram/km²; ^ede som van de vijf relatieve dierdichtheden.

4 Discussie

In oppervlaktewater in landelijk gebied werden ESBL/AmpC-*E. coli* aangetroffen. De prevalentie en concentraties van deze bacteriën zijn lager dan in andere studies werden gedetecteerd in wateren benedenstreams van RWZIs of slootjes aangrenzend aan pluimveebedrijven.

De isolaten uit het agrarische oppervlaktewater waren wat betreft de ESBL- en AmpC-gen frequentie en prevalentie van het klinische *E. coli* type ST131 meer vergelijkbaar met isolaten uit mest dan die uit effluent. Dit bevestigt dat de onderzochte locaties inderdaad grotendeels agrarisch beïnvloed zijn. Ondanks het doel waarvoor de MNLISO locaties geselecteerd zijn kan een humane invloed niet geheel uitgesloten worden. Sommige locaties kunnen afhankelijk van weersomstandigheden op enige tijdstippen onder invloed staan van riooloverstorten of inlaatwater. Dat de ESBL genfrequenties in oppervlaktewaterisolaten iets afwijken van de mestisolaten (iets meer CTX-M-14 en CTX-M-15, iets minder CTX-M-1 en SHV-12), zou verklaard kunnen worden door een menging met humane isolaten, of met isolaten afkomstig uit watervogels (Veldman et al. 2013) die deze bacteriën mogelijk op een andere plek (mogelijk wel onder invloed van humaan afvalwater) kunnen hebben opgepikt. Een andere verklaring voor de lichte discrepantie tussen mest- en waterisolaten kan zijn dat de mestisolaten afkomstig zijn uit een beperkte hoeveelheid mestmonsters die mogelijk niet helemaal representatief is voor de mest die is uitgereden - en de dieren die werden gehouden - in de onderzochte gebieden. Ook is de verhouding tussen diertypen in de onderzochte mestmonsters niet noodzakelijkerwijs representatief voor de verhouding tussen typen uitgereden mest.

De aanwezigheid van een relatief hoog percentage kippenbedrijven in een gebied leek een lichte invloed te hebben op het percentage positieve monsters en de jaargemiddelde ESBL/AmpC-EC concentraties. Ook leek het aantal leghennen (maar niet vleeskuikens) per km² de jaargemiddelde ESBL/AmpC-EC concentraties te beïnvloeden. Dit kan mogelijk verklaard worden doordat ruim een kwart van de leghennen in vrije uitloop worden gehouden (Agrimatie.nl 2019) en dat deze uitwerpselen met neerslag afspoelen naar oppervlaktewater. De in eerder onderzoek gevonden prevalentie en concentraties van ESBL-EC in slootjes aangrenzend aan pluimveebedrijven, en met name vleeskuikenbedrijven, was relatief hoog vergeleken met wat op de huidige onderzochte MNLISO locaties gevonden is (Blaak et al. 2015b). Dit kan, onder andere, verklaard worden door het feit dat de huidige meetlocaties niet noodzakelijkerwijs aangrenzend aan pluimveebedrijven hoeven te liggen, en mogelijk dus verder verwijderd zijn van eventuele fecale bronnen. Ook is er in het eerdere onderzoek voor gezorgd dat een deel van de bemonstering uitgevoerd werd tijdens of vlak na het schoonmaken van bedrijven, wat een grote bron van emissie naar aangrenzende slootjes bleek. Of tijdens de huidige studie dergelijke extreme situaties zijn meegenomen is onderhevig aan toeval en daarom niet waarschijnlijk.

Opvallend is dat er geen correlatie werd gezien tussen ESBL/AmpC-EC in oppervlaktewater en de dichtheid van andere landbouwhuisdieren of andere LBH bedrijven. Uit metingen in mest blijkt dat deze bacteriën nog vaker bij rundvee, kalveren en varkens voorkomen dan bij leghennen (Schmitt et al. 2019). Met name melkvee staat vaak buiten en daarom zou aangenomen kunnen worden dat ook uitwerpselen van weidekoeien door afspoeling het oppervlaktewater zullen beïnvloeden. Mogelijk is het verschil in beïnvloeding door leghennen en melkkoeien (en andere diersoorten) te verklaren doordat de ESBL/AmpC-EC concentratie in leghennenmest bijna 1000 keer hoger is dan in melkvee, en ongeveer 100 keer hoger dan in varkens en vleeskalveren (Schmitt et al. 2019).

Er bleek geen correlatie tussen prevalentie en concentraties van ESBL/AmpC-EC (of totale *E. coli*) en het uitrijden van mest. Voor totale *E. coli* was eerder sprake van een omgekeerd effect: de concentraties waren hoger buiten het mestuitrijdseizoen, en in een univariate analyse was er een negatieve correlatie met hoeveelheden uitgereden mest. Het is niet duidelijk wat deze negatieve associatie verklaart. Mogelijk zijn er bepaalde factoren die een positief effect hebben op *E. coli* concentraties die negatief geassocieerd zijn met (de timing van) het uitrijden van mest, zoals de watertemperatuur (Vermeulen and Hofstra 2014). De watertemperatuur is naar verwachting buiten het mestuitrijdseizoen lager dan binnen het mestuitrijdseizoen en een lagere temperatuur is geassocieerd met een langere overleving van *E. coli* in water (Franz et al. 2014). Aan de andere kant lijkt deze verklaring tegenstrijdig met het feit dat eenzelfde effect niet werd gevonden voor ESBL-EC. Ondanks de afwezigheid van een correlatie met de hier gebruikte parameters voor mestuitrijden, duidt het feit dat het effect van extreme neerslag groter was tijdens het mestuitrijdseizoen dan daarbuiten, er op dat er mogelijk toch sprake is van emissie van ESBL/AmpC-EC vanuit mest naar oppervlaktewater. Weliswaar zal naar verwachting bij sterke regenval ook meer ESBL/AmpC vanuit bedrijven naar het oppervlaktewater afspoelen, maar het lijkt aannemelijk dat dit in dezelfde mate gebeurt binnen en buiten het mestuitrijdseizoen.

De afwezigheid van correlaties tussen het voorkomen van ESBL/AmpC-EC in oppervlaktewater en het uitrijden van mest of de aanwezigheid van landbouwhuisdieren anders dan leghennen, komt mogelijk voort uit het feit dat de agrarische invloed op oppervlaktewater niet alleen multifactorieel is maar ook tijdsafhankelijk. De verschillende agrarische fecale bronnen: uitgereden mest, uitwerpselen van weide- en vrije uitloopdieren en fecaliën op erven en in stallen op LBH bedrijven, kunnen in verschillende gebieden in een verschillende verhouding bijdragen aan de emissie van ESBL/AmpC-EC naar oppervlaktewater. De verhouding waarin de verschillende agrarische bronnen bijdragen kan daarnaast op hetzelfde meetpunt verschillen tussen tijdstippen, afhankelijk bijvoorbeeld van het exacte moment van mestuitrijden, of bepaalde activiteiten op LBH bedrijven zoals het schoonmaken van stallen. Tenslotte is de absolute bijdrage van de verschillende agrarische bronnen afhankelijk van zowel of en hoeveel neerslag er valt alsook de timing van de neerslag ten opzichte van het tijdstip waarop de fecaliën op of in de bodem gebracht zijn. Daarnaast speelt in de huidige studie ook nog mee dat de dierdichtheden en hoeveelheden uitgereden mest

werden vastgesteld op gemeenteniveau. Het is denkbaar dat tussen gemeenten met vergelijkbare hoeveelheden mest en dierdichtheden de invloed hiervan op meetpunten kan verschillen, afhankelijk van de ligging van het meetpunt t.o.v. de bedrijven en bemestte percelen. Op dit moment worden door Deltares i.s.m. de waterschappen de gehele stroomgebieden van de meetpunten in kaart gebracht (J. Klein, persoonlijke communicatie). Voor het bepalen van de agrarische invloed op een meetpunt is het stroomgebied waarschijnlijk een relevantere afbakening dan de gemeente. Echter, gegevens over mestuitrijden zijn voor deze gebieden niet bekend. Wel zou het mogelijk zijn in de toekomst een analyse te doen gebaseerd op LBH bedrijven en aantallen dieren per stroomgebied. Om het effect van uitgereden mest op ESBL/AmpC-EC concentraties in water onomstotelijk vast te stellen, is informatie nodig over de hoeveelheid uitgereden mest en wanneer deze uitgereden gaat worden, om de timing van monsternamen op aan te passen. Daarnaast moet het bij voorkeur binnen beperkte tijd na bemesting gaan regenen omdat anders de bacteriën in de mest mogelijk afsterven voordat ze afspoelen. Tenslotte moeten de ESBL/AmpC-EC ook nog in de mest zitten. Dit geeft aan dat het niet eenvoudig is de invloed van mest op bacterieconcentraties in water op een goede wijze te onderzoeken.

Voor het vaststellen van het effect van neerslag op de bacterieconcentraties in het oppervlaktewater zijn neerslaggegevens gebruikt van de dag voorafgaand aan de monsternamen. In eerder onderzoek uitgevoerd in grote Nederlandse rivieren bleek de *E. coli* concentraties sterker te correleren met de som van de neerslag in drie dagen voorafgaand aan monsternamen (Vermeulen and Hofstra 2014). Die bevinding hangt mogelijk samen met het feit dat er vertraging is tussen het vallen van neerslag en het effect op bacterieconcentraties in het water (Tornevi et al. 2014): de bacteriën moeten uit mest of bodem los komen en naar het water afspoelen. De huidige *E. coli* concentraties correleerden echter even goed met de hoeveelheid neerslag die de dag van te voren was gevallen als met de hoeveelheid neerslag die in totaal op de twee of drie dagen van te voren was gevallen (data niet getoond). De verschillen tussen de huidige en de eerdere Nederlandse studie worden mogelijk verklaard door verschillen in de onderzochte wateren: in de eerdere studie waren dat grote rivieren die beïnvloed worden door zowel humane als agrarische bronnen, in de huidige studie voornamelijk kleine waterlopen die enkel beïnvloed worden door agrarische bronnen. ESBL/AmpC-EC concentraties in het oppervlaktewater waren, in tegenstelling tot wat voor *E. coli* concentraties werd gezien, duidelijk het beste gecorreleerd met de hoeveelheid neerslag op de dag van te voren (data niet getoond).

Vier keer (en op drie locaties) zijn zeer hoge aantallen ESBL/AmpC-EC aangetroffen van rond de 1000 kve/l; dit is in de orde van grootte van de concentraties in RWZI effluent. Bij twee van deze vier gevallen ging dit gepaard met meer dan 10 mm neerslag op de dag voorafgaand aan de monsternamen. De neerslaghoeveelheden zijn bepaald aan de hand van de metingen bij de dichtstbijzijnde neerslagstations. Deze kunnen 1 tot 10 km van de meetlocatie verwijderd zijn en effecten van hele plaatselijke buien kunnen niet uitgesloten worden. Ondanks de criteria die gebruikt zijn voor de selectie van de MNLISO locaties kan het niet

helemaal uitgesloten worden dat dergelijk extreem hoge concentratie (deels) toch door riooloverstorten veroorzaakt werden en niet (alleen) door een verhoogde afspoeling van land of erf. In water bemonsterd van riooloverstorten zijn eerder zeer hoge concentraties ESBL-EC aangetroffen (Blaak et al. 2018).

De aanwezigheid van ESBL/AmpC-EC in oppervlaktewater in agrarisch gebied wat in principe niet beïnvloed wordt door humaan afvalwater toont aan dat agrarische activiteiten bijdragen aan het voorkomen van ESBL/AmpC-EC in oppervlaktewater. De mate van beïnvloeding van oppervlaktewater gerelateerd aan agrarische activiteit is minder dan dat gerelateerd aan lozingen van humaan afvalwater. Dit is mogelijk te verklaren doordat landbouw en humaan afvalwater verschillende soorten contaminatiebronnen zijn. In tegenstelling tot RWZI effluentlozingen zijn agrarische fecale bronnen niet-continue bronnen. De emissie is niet continu omdat het grotendeels samenhangt met activiteiten die niet continu worden uitgevoerd (zoals mestuitrijden of schoonmaken van stallen) en omdat er afspoeling nodig is om het oppervlaktewater te bereiken. Of en hoeveel feces en fecale bacteriën vanuit uitgereden mest, weide- en vrije uitloofdieren of LBH bedrijven naar oppervlaktewater afspoelen is grotendeels afhankelijk van of en wanneer er neerslag valt. De fecale bacteriën blijven met de mest op of in de bodem tot er neerslag valt (of beregend wordt), en vervolgens moet er een bepaalde afstand afgelegd worden naar het oppervlaktewater. Tijdens deze verblijf- en reistijd zal een deel afsterven (Blaustein et al. 2015, Franz et al. 2014). Hoe groot het overlevende deel is hangt onder andere af van hoe snel na het op of in de bodem terechtkomen van de mest of uitwerpselen er afspoeling plaatsvindt. Daarnaast speelt het feit dat agrarische fecale bronnen diffuse bronnen zijn ook mogelijk een rol in de verschillen tussen agrarisch beïnvloedde wateren en wateren onder invloed van humaan afvalwater. Bij grote puntbronnen, zoals RWZI effluent lozingen en riooloverstorten is de ESBL-EC concentratie in het oppervlaktewater vlak bij het lozingspunt nagenoeg hetzelfde als in de bron zelf (Blaak et al. 2018). Benedenstrooms neemt de concentratie geleidelijk af, hoewel het effect van effluentlozingen nog meetbaar kunnen zijn tot 3,5 km benedenstrooms (Blaak et al. 2018). In agrarisch gebied kunnen de bacteriën vanaf verschillende plekken in het ontvangende water terecht komen en zijn de bacterieconcentraties op de plekken waar dat gebeurt waarschijnlijk in het algemeen lager dan bij grote puntbronnen.

De afhankelijkheid van neerslag en het diffuse karakter van agrarische bronnen betekent waarschijnlijk dat de beïnvloeding van oppervlaktewater vanuit agrarische bronnen het grootste deel van de tijd gering is, maar dat er van tijd tot tijd piek-emissies plaats kunnen vinden. Dit wordt ondersteund door eerdere bevindingen gerelateerd aan schoonmaken van pluimveestallen (Blaak et al. 2015b), en de in deze studie waargenomen piekconcentraties op sommige meetdagen op sommige meetlocaties en het grote effect van extreme neerslag op ESBL/AmpC-EC concentraties.

5 Referenties

Agrimatie.nl (2019)

<https://www.agrimatie.nl/ThemaResultaat.aspx?subpubID=2232&themaID=2270&indicatorID=2098>.

Anonymous (1992) NEN 6559 Bacteriologisch onderzoek van water – Monsterneming en conservering.

Blaak, H., de Kruijf, P., Hamidjaja, R.A., van Hoek, A.H.A.M., de Roda Husman, A.M. and Schets, F.M. (2014) Prevalence and characteristics of ESBL-producing *E. coli* in Dutch recreational waters influenced by wastewater treatment plants. *Vet Microbiol* 171(3-4), 448-459.

Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M. and de Roda Husman, A.M. (2015a) Multidrug-Resistant and Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Dutch Surface Water and Wastewater. *PLoS One* 10(6), e0127752.

Blaak, H., Schets, F.M., Italiaander, R., Schmitt, H. and De Roda Husman, A.M. (2010) Antibioticaresistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater in veeteeltgebied. RIVM rapport 703719031.

Blaak, H., Schilperoort, R. and Schmitt, H. (2018) Rol van afvalwater bij verspreiding van antibioticaresistente *Escherichia coli* en ampicillineresistente *Enterococcus faecium* in oppervlaktewater. STOWA RIONED rapport 2018-11.

Blaak, H., van Hoek, A.H., Hamidjaja, R.A., van der Plaats, R.Q., Kerkhof-de Heer, L., de Roda Husman, A.M. and Schets, F.M. (2015b) Distribution, Numbers, and Diversity of ESBL-Producing *E. coli* in the Poultry Farm Environment. *PLoS One* 10(8), e0135402.

Blaak, H., van Rooyen, S.R., Schuijt, M.S., Docters van Leeuwen, A.E., van den Berg, H.H.J.L., Lodder-Verschoor, F., Italiaander, R., Schets, F.M. and de Roda Husman, A.M. (2011) Prevalence of antibiotic resistant bacteria in the rivers Meuse, Rhine and New Meuse. RIVM report 703719071.

Blaustein, R.A., Pachepsky, Y.A., Shelton, D.R. and Hill, R.L. (2015) Release and Removal of Microorganisms from Land-Deposited Animal Waste and Animal Manures: A Review of Data and Models. *J Environ Qual* 44(5), 1338-1354.

Carattoli, A., Garcia-Fernandez, A., Varesi, P., Fortini, D., Gerardi, S., Penni, A., Mancini, C. and Giordano, A. (2008) Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases isolated in Rome, Italy. *J Clin Microbiol* 46(1), 103-108.

Carlos, C., Pires, M.M., Stoppe, N.C., Hachich, E.M., Sato, M.I., Gomes, T.A., Amaral, L.A. and Ottoboni, L.M. (2010) *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiol* 10, 161.

CBS (2011) StatLine: Lozing van afvalwater door huishoudens en bedrijven.

<http://statline.cbs.nl/StatWeb/publication/?VW=T&DM=SLNL&PA=70223ned&D1=a,19-10&D2=0&D3=a&HD=090624-1001&HDR=G1,G2&STB=T>.

CBS (2014) Dierlijke mest en mineralen; productie, transport en gebruik 2014. <http://statline.cbs.nl>.

- CBS (2015a) Dierlijke mest en mineralen; productie, transport en gebruik 2015. <http://statline.cbs.nl>.
- CBS (2015b) Landbouw; gewassen, dieren en grondgebruik naar gemeente 2015. <http://statline.cbs.nl>.
- CBS (2016a) Kerncijfers wijken en buurten 2016. <http://statline.cbs.nl>.
- CBS (2016b) Landbouw; gewassen, dieren en grondgebruik naar gemeente 2016. <http://statline.cbs.nl>.
- CBS (2018) Dierlijke mest; productie en mineralenuitscheiding, diercategorie, regio 2018. <http://statline.cbs.nl>.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2015) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twentieth informational supplement M100-S25, CLSI, Wayne, PA, USA.
- Coque, T.M., Novais, A., Carattoli, A., Poirel, L., Pitout, J., Peixe, L., Baquero, F., Canton, R. and Nordmann, P. (2008) Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis* 14(2), 195-200.
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C. and Arlet, G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 65(3), 490-495.
- Dorado-Garcia, A., Smid, J.H., van Pelt, W., Bonten, M.J.M., Fluit, A.C., van den Bunt, G., Wagenaar, J.A., Hordijk, J., Dierikx, C.M., Veldman, K.T., de Koeijer, A., Dohmen, W., Schmitt, H., Liakopoulos, A., Pacholewicz, E., Lam, T., Velthuis, A.G., Heuvelink, A., Gonggrijp, M.A., van Duijkeren, E., van Hoek, A., de Roda Husman, A.M., Blaak, H., Havelaar, A.H., Mevius, D.J. and Heederik, D.J.J. (2018) Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemother* 73(2), 339-347.
- Doumith, M., Day, M.J., Hope, R., Wain, J. and Woodford, N. (2012) Improved multiplex PCR strategy for rapid assignment of the four major *Escherichia coli* phylogenetic groups. *J Clin Microbiol* 50(9), 3108-3110.
- Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S. and Wieler, L.H. (2012) Extended-spectrum beta-lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect* 18(7), 646-655.
- Franz, E., Schijven, J.F., De Roda Husman, A.M. and Blaak, H. (2014) Meta-regression analysis of commensal and pathogenic *Escherichia coli* survival in soil and water. *Environ Sci Technol* 48(12), 6763-6771.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P.B. and Christensen, R.H.B. (2017) lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *Journal of statistical software* 82(13), 1-26.
- MARAN (2018) Monitoring of antimicrobial resistance and antibiotic usage in animals in the Netherlands in 2017. Available: <https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksinstituten/Bioveterinary-Research/Publicaties/MARAN-rapporten-antibioticaresistentie.htm>.
- Veldman, K.T., Mevius, D.J., Wit, B., van Pelt, W. and Heederik, D. (eds).
- Matsumura, Y., Pitout, J.D., Gomi, R., Matsuda, T., Noguchi, T., Yamamoto, M., Peirano, G., DeVinney, R., Bradford, P.A., Motyl, M.R., Tanaka, M., Nagao, M., Takakura, S. and Ichiyama, S. (2016) Global

- Escherichia coli Sequence Type 131 Clade with blaCTX-M-27 Gene. *Emerg Infect Dis* 22(11), 1900-1907.
- Nicolas-Chanoine, M.H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Canica, M.M., Park, Y.J., Lavigne, J.P., Pitout, J. and Johnson, J.R. (2008) Intercontinental emergence of Escherichia coli clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 61(2), 273-281.
- Olesen, I., Hasman, H. and Aarestrup, F.M. (2004) Prevalence of beta-lactamases among ampicillin-resistant Escherichia coli and Salmonella isolated from food animals in Denmark. *Microb Drug Resist* 10(4), 334-340.
- Overdeest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., van der Zwaluw, K., Huijsdens, X. and Kluytmans, J. (2011) Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, The Netherlands. *Emerg Infect Dis* 17(7), 1216-1222.
- Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J. and Leverstein-van Hall, M.A. (2006) Enterobacter cloacae outbreak and emergence of quinolone resistance gene in Dutch hospital. *Emerg Infect Dis* 12(5), 807-812.
- Petty, N.K., Ben Zakour, N.L., Stanton-Cook, M., Skippington, E., Totsika, M., Forde, B.M., Phan, M.D., Gomes Moriel, D., Peters, K.M., Davies, M., Rogers, B.A., Dougan, G., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A., Pitout, J.D., Upton, M., Paterson, D.L., Walsh, T.R., Schembri, M.A. and Beatson, S.A. (2014) Global dissemination of a multidrug resistant Escherichia coli clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(15), 5694-5699.
- R core team (2018) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- RVO (2018a) <https://www.rvo.nl/onderwerpen/agrarisch-ondernemen/mestbeleid/mest/mest-uitrijden-en-gebruiken/dierlijke-mest>.
- RVO (2018b) <https://www.rvo.nl/onderwerpen/agrarisch-ondernemen/mestbeleid/mest/mest-uitrijden/hoe-mest-uitrijden>.
- Schmitt, H., Blaak, H., Kemper, M., van Passel, M., Hierink, F., van Leuken, J., De Roda Husman, A.M., van der Grinten, E., Rutgers, M., Schijven, J., De Man, H., Hoeksma, P. and Zuidema, T. (2017) Bronnen van antibioticaresistente bacterien in het milieu en mogelijke maatregelen. RIVM Rapport 2017-0085.
- Schmitt, H., Blaak, H., van de Schans, M., Kemper, M., de Rijk, S. and De Roda Husman, A.M. (2019) Antibioticaresistente bacterien, resistentiegenen en antibioticaresiduen in mest. RIVM rapport 2019-0112.
- Tornevi, A., Bergstedt, O. and Forsberg, B. (2014) Precipitation effects on microbial pollution in a river: lag structures and seasonal effect modification. *PLoS One* 9(5), e98546.
- Veldman, K., van Tulden, P., Kant, A., Testerink, J. and Mevius, D. (2013) Characteristics of cefotaxime-resistant Escherichia coli from wild birds in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 79(24), 7556-7561.
- Vermeulen, L. and Hofstra, N. (2014) Influence of climate variables on the concentration of *Escherichia coli* in the Rhine, Meuse, and Drentse Aa during 1985-2010. *Reg Environ Change* 14, 307-319.
- Voets, G.M., Fluit, A.C., Scharringa, J., Schapendonk, C., van den Munckhof, T., Leverstein-van Hall, M.A. and Stuart, J.C. (2013) Identical plasmid AmpC beta-lactamase genes and plasmid types in E. coli

isolates from patients and poultry meat in the Netherlands. *Int J Food Microbiol* 167(3), 359-362.

White, A.P., Sibley, K.A., Sibley, C.D., Wasmuth, J.D., Schaefer, R., Surette, M.G., Edge, T.A. and Neumann, N.F. (2011) Intergenic sequence comparison of *Escherichia coli* isolates reveals lifestyle adaptations but not host specificity. *Appl Environ Microbiol* 77(21), 7620-7632.

Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P.R., Maiden, M.C., Ochman, H. and Achtman, M. (2006) Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol Microbiol* 60(5), 1136-1151.

6 Bijlagen

6.1 Monsterlocaties

Nr.	Locatiennaam	Waterschap	Meetpunt	XY coördinaten
1	1e DWARSTOCHT M'RKAPELLE via Herenweg va duiker	Schieland en Krimpenerwaard	303	52.05387, 4.56984
2	Barneveldsebeek Barneveld	Vallei en Veluwe	287201	52.13245, 5.56907
3	Benedenstrooms Papenvoortsesteeg = Tovensebeek	Aa en Maas	900068	51.64661, 5.87083
4	Bergerslagbeek	Rijn en IJssel	BSB01	51.90103, 6.38975
5	Dalmsholt	Drents Overijsselse Delta	SDW98	52.46532, 6.25379
6	Diepenhoekse Loop	Aa en Maas	140229	51.33371, 5.71650
7	Drentsche Aa	Hunze en Aas	2101	53.12966, 6.61918
8	Drgm.Zuidpld. v. Delfgauw, Molentocht	Delfland	OW221B011	51.99388, 4.43409
9	Esvelderbeek Hoevelaken	Vallei en Veluwe	287052	52.16291, 5.45943
10	Gansbeek Schelkenspoort	Limburg	OGANS900	51.29581, 6.09289
11	Goorloop	Aa en Maas	900238	51.43310, 5.63035
12	Groote Wetering Molenhoeve stuw k	Aa en Maas	140299	51.69235, 5.56743
13	Grote beek	Rijn en IJssel	GRB03	52.05569, 6.17238
14	GRUTTOTOCHT, onder brug A6	Zuiderzeeland	26AZ-049-01	52.38664, 5.31272
15	Halse Beek	Aa en Maas	341429	51.72417, 5.71764
16	Hazelbeek, verlengde Boakenkampsweg, Vasse	Vechtstromen	06-212	52.42475, 6.83788
17	Hierdense Beek, Hierden, Waterweg	Vallei en Veluwe	243520	52.36696, 5.68938
18	Leerinkbeek	Rijn en IJssel	LEB01	52.10865, 6.53411
19	Leveroyschebeek Strubben	Limburg	OLEVE900	51.27011, 5.90234
20	Lorregraaf	Aa en Maas	343515	51.77318, 5.39880
21	Luntersebeek Scherpenzeel	Vallei en Veluwe	288003	52.06958, 5.48419
22	Maasnielderbeek Duiperweg	Limburg	OMSNL170	51.19022, 6.05358
23	Mosbeek, Wennerkamp, Mander	Vechtstromen	06-204	52.44187, 6.80419
24	NOKVAART, P.G.Otterweg t.n.v.Tjalleberd	Fryslan	79	53.01781, 5.94438
25	NOORDWOLDERVAART, Vinkegavaartweg	Fryslan	133	52.88505, 6.10669
26	Oude Leesk - polder "Amsweer"	Hunze en Aas	5234	53.29834, 6.90302

Nr.	Locatiennaam	Waterschap	Meetpunt	XY coördinaten
27	Peelrijt	Dommel	240045	51.38544, 5.66145
28	Poelsbeek, Poortweg, Het Weldam, Goor	Vechtstromen	20-008	52.21924, 6.58903
29	Poldersloot	Hunze en Aas	5223	53.26511, 6.75150
30	Reusel	Dommel	240102	51.41960, 5.14292
31	Run	Dommel	240035	51.39261, 5.40222
32	Schelkensbeek St. Gerlachusdijk	Limburg	OSCHE100	51.26727, 6.08572
33	Schoolbeek, Baardinksweg, Tweekelo	Vechtstromen	20-214	52.23863, 6.81530
34	Springendalsebeek, Uelserdijk, Ootmarsum	Vechtstromen	34-050	52.43168, 6.90439
35	Spruitenstroompje	Dommel	240104	51.50451, 5.16061
36	St. Jansbeek	Aa en Maas	340412	51.63984, 5.97636
37	Taarlosche Diep	Hunze en Aas	2212	53.02224, 6.63225
38	Tasbeek Kessel Schijfweg	Limburg	OTASB900	51.29899, 6.07143
39	Teugenmaar - polder "de Nijverheid"	Hunze en Aas	5233	53.30139, 6.85272
40	Veldbeek, Putten, Tintelersteeg	Vallei en Veluwe	253230	52.24081, 5.53317
41	Vinkenloop	Aa en Maas	341415	51.57887, 5.85544
42	Voorste Diep	Hunze en Aas	4212	52.96364, 6.83241
43	VUURSTEENTOCHT, duiker Wisentweg	Zuiderzeeland	20GZ-031-01	52.52272, 5.59024
44	Watergang Broeklanden	Vechtstromen	BBRO95	52.75635, 6.76617
45	WL 011-30 aan de Knokerdweg (=loop van Kattenloop naar 't Goor)	Aa en Maas	143273	51.62944, 5.62636
46	Zevenblokkengrift	Noorderzijlvest	6504	52.99336, 6.46815
47	Zieversbeek Schuurmolen	Limburg	OZIEV700	50.77915, 5.99909
48	Zijbeek van het Uddelerveen, Ermelo, Uddelermeerweg	Vallei en Veluwe	245010	52.26266, 5.75266
49	zijsloot bovenloop KLEINDIEP, De Maden	Fryslan	113	52.96437, 6.31475
50	Zijtak Ommerkanaal, vanuit Kikkerhoek	Vechtstromen	KZOK98	52.63229, 6.56861
51	ZWOLSETOCHT, duiker Hondweg	Zuiderzeeland	20CZ-018-01	52.52515, 5.78647

6.2 Primers gebruikt voor moleculaire analyses

PCR primers gebruikt voor aantonen aanwezigheid van genen

Primer	Sequentie	Groote PCR product (bp)	Hybridisatie positie^a
CTX-M-1g_61F	5'- TTA GGA ART GTG CCG CTG YA-3'	688	61 – 80
CTX-M-1g_748R	5'- CGA TAT CGT TGG TGG TRC CAT-3'		748 – 728
CTX-M-9g_299F	5'-TCA AGC CTG CCG ATC TGG T-3'	561	299 – 317
CTX-M-9g_859R	5'-TGATTCTCGCCGCTGAAG-3'		859 – 842
TEM_13F	5'-CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC-3'	800	13 – 34
TEM_812R	5'-CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC-3'		812 – 791
SHV_71F	5'-AGCCGCTTGAGCAAATTAAC-3'	713	71 – 91
SHV_783R	5'-ATCCCGCAGATAAATCACCAC-3'		783 – 763
OXA_201F	5'-GGCACCAGATTCAACTTTCAAG-3'	564	201 – 222
OXA_764R	5'-GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG-3'		764 – 743
CIT_570F	5'-CGAAGAGGCAATGACCAGAC-3'	538	570 – 589
CIT_1107R	5'-ACGGACAGGGTTAGGATAGY-3'		1107 – 1088

Primers en PCR condities zijn afkomstig uit de publicatie van Dallenne et al. (Dallenne et al. 2010). ^aVanaf base 'A' van start het codon (ATG). bp=baseparen.

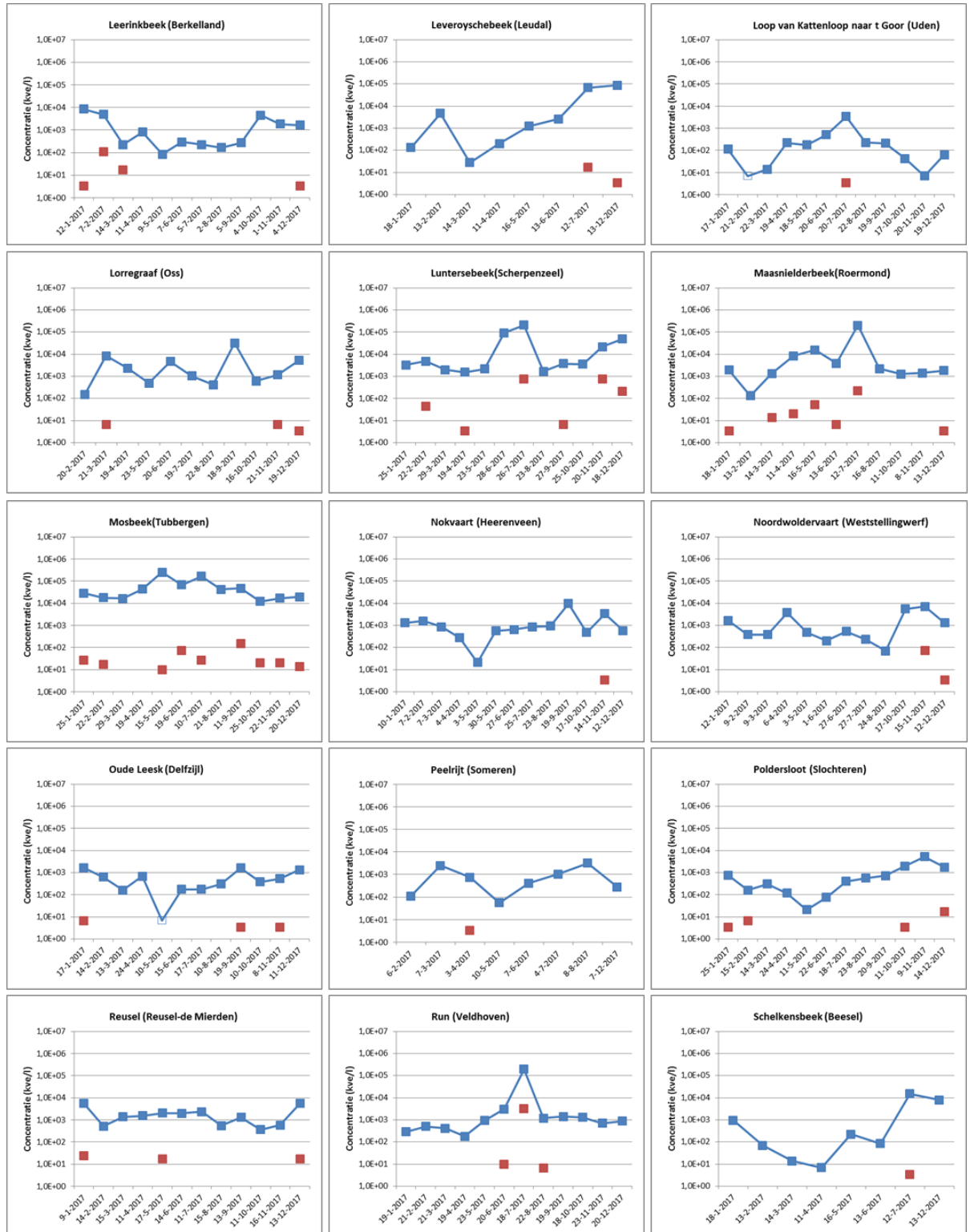
Primers gebruikt voor sequencena

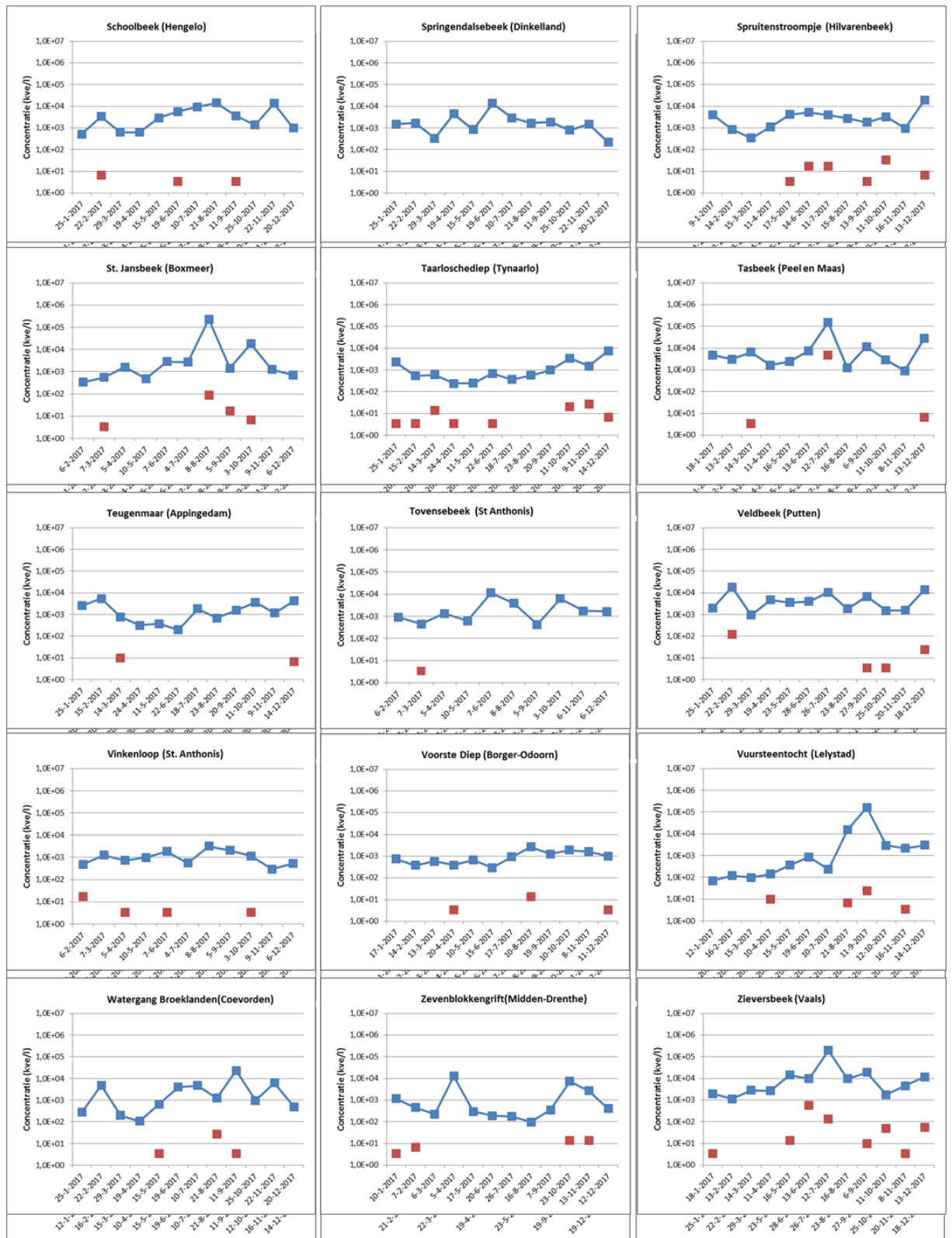
Primer	Sequentie	Hybridisatie positie^b	Groot-te PCR product (bp)	Grootte PCR product (az)	Positie (aa)	Ref.^c
CTX-M-1g_-3F ^f	5'- CCC ATG GTT AAA AAA TCA CTG C-3'	-3 - 19 ^f				1
CTX-M-1g_+65	5'-CAG CGC TTT TGC CGT CTA AG'-3'	+65 - +47 ^e	825	273	19 - 291	1
CTX-M-9g_2F	5'-TGG TGA CAA AGA GAG TGC AAC G-3'	2 - 23				2
CTX-M-9g_876R	5'-TCA CAG CCC TTC GGC GAT-3'	876 - 859	835	278	9 - 286	2
TEM_13F	5'-CAT TTC CGT GTC GCC CTT ATT C-3'	13 - 34				3
TEM_859R	5'- ACC AAT GCT TAA TCA GTG AG-3'	859 - 840	786	262	15 - 276	4
SHV_23F	5'- TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC-3'	23 - 42				4
SHV_819R	5'- GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG-3'	819 - 800	757	252	15 - 266	4

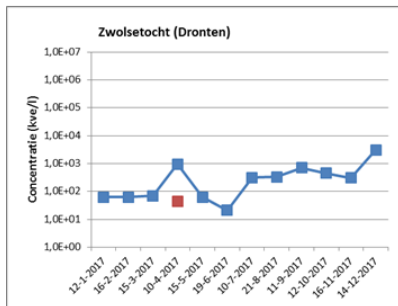
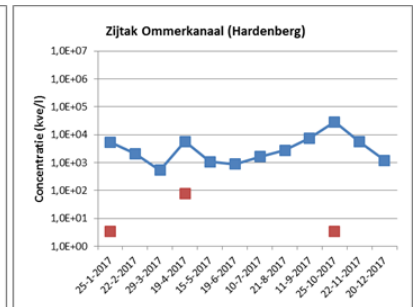
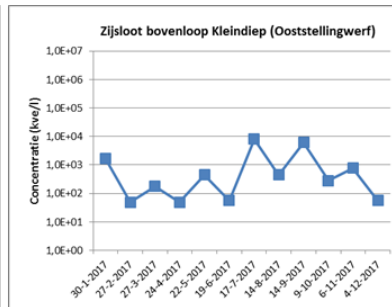
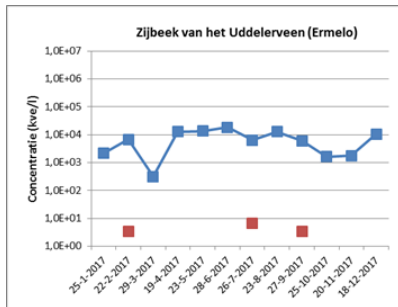
^aIndien afwijkend van de primers gebruikt voor aantonen aanwezigheid. ^bVanaf base 'A' van start het codon (ATG). ^cReferences: 1=(Carattoli et al. 2008), 2=(Paauw et al. 2006), 3=(Dallenne et al. 2010), 4=(Olesen et al. 2004),. bp=baseparen, az=aminozuren.

6.3 *E. coli* en ESBL/AmpC-EC concentraties per meetpunt en tijdstip.

E. coli concentraties zijn weergegeven in blauw, ESBL/AmpC-concentraties in rood.







6.4 Prevalentie en gemiddelde bacterieconcentraties per locatie

#	Waterloop	Gemeente	Aantal monsters	E. coli (kve/l)	ESBL/AmpC-EC (kve/l)	ESBL-/AmpC-EC Prevalentie ^a
1	1e Dwarstocht	Zuidplas	12	1,1E+03	0,83	8%
2	Barneveldsebeek	Barneveld	12	1,5E+04	37	75%
3	Bergerslagbeek	Oude IJsselstreek	12	1,3E+04	3,1	17%
4	Dalmsholt	Dalfsen	12	3,9E+03	12	42%
5	Diepenhoekse Loop	Someren	11	1,0E+05	31	73%
6	Drentsche Aa	Haren	12	7,9E+03	24	42%
7	Esvelderbeek	Amersfoort	12	7,8E+03	23	50%
8	Gansbeek	Venlo	12	2,0E+04	8,9	25%
9	Goorloop	Geldrop-Mierlo	11	1,8E+03	0,6	9%
10	Groote Wetering	Bernheze	12	2,2E+02	0	0%
11	Grote Beek	Bronckhorst	12	2,5E+02	0,3	8%
12	Gruttotocht	Almere	12	9,1E+02	0,3	8%
13	Halse Beek	Mill en Sint Hubert	6	7,1E+03	0	0%
14	Hazelbeek	Tubbergen	12	6,5E+03	0,3	8%
15	Hierdense Beek	Nunspeet	11	7,4E+04	1,2	9%
16	Leerinkbeek	Berkelland	12	2,0E+03	11	33%
17	Leveroyschebeek	Leudal	8	2,0E+04	2,5	25%
18	Loop van Kattenloop naar 't Goor	Uden	12	4,1E+02	0,3	8%
19	Lorregraaf	Oss	11	5,2E+03	1,5	27%
20	Luntersebeek	Scherpenzeel	12	3,3E+04	148	50%
21	Maasnielderbeek	Roermond	11	2,2E+04	29	64%
22	Molentocht	Pijnacker-Nootdorp	12	2,6E+03	0,6	17%
23	Mosbeek	Tubbergen	12	6,1E+04	30	75%
24	Nokvaart	Heerenveen	13	1,6E+03	0,3	8%
25	Noordwoldervaart	Weststellingwerf	12	1,8E+03	6,2	17%
26	Oude Leesk	Delfzijl	12	6,4E+02	1,1	25%
27	Peelrijt	Someren	8	1,0E+03	0,4	13%
28	Poelsbeek	Hof van Twente	12	2,0E+03	8,8	33%
29	Poldersloot	Slochteren	12	1,0E+03	2,5	33%
30	Reusel	Reusel-De Mierden	12	2,0E+03	4,7	25%
31	Run	Veldhoven	12	1,7E+04	268	25%
32	Schelkensbeek	Beesel	8	3,0E+03	0	13%
33	Schoolbeek	Hengelo	12	4,7E+03	1,1	25%
34	Springendalsebeek	Dinkelland	12	2,6E+03	0	0%
35	Spruitenstroompje	Hilvarenbeek	12	4,0E+03	6,7	50%
36	St. Jansbeek	Boxmeer	11	2,4E+04	11	36%
37	Taarlosche Diep	Tynaarlo	12	1,6E+03	6,7	67%
38	Tasbeek	Peel en Maas	12	1,9E+04	401	25%
39	Teugenmaar	Appingedam	12	1,9E+03	1,4	17%
40	Tovensebeek	Sint Anthonis	10	2,9E+03	0,3	10%
41	Veldbeek	Putten	12	5,8E+03	13	33%
42	Vinkenloop	Sint Anthonis	11	1,2E+03	2,4	36%
43	Voorste Diep	Borger-Odoorn	12	1,0E+03	1,7	25%
44	Vuursteentocht	Lelystad	12	1,5E+04	3,6	33%

45	Watergang Broeklanden	Coevorden	12	3,9E+03	2,8	25%
46	Zevenblokkengrft	Midden-Drenthe	12	2,2E+03	3,1	33%
47	Zieversbeek Schuurmolen	Vaals	12	2,3E+04	69	67%
48	Zijbeek van het Uddelerveen	Ermelo	12	7,7E+03	1,1	25%
49	Zijsloot bovenloop Kleindiep	Ooststellingwerf	12	1,5E+03	0	0%
50	Zijtak Ommerkanaal	Hardenberg	12	5,3E+03	6,9	25%
51	Zwolsetocht	Dronten	12	5,4E+02	3,6	8%

^aPercentage postieve monsters per locatie

6.5 Gebruikte afkortingen

ABR	Antibioticaresistentie
ABR bacteriën	Antibioticaresistente bacteriën
AmpC	Ampicillinase C
CBS	Centraal Bureau voor de statistiek
CTX	Cefotaxime
EC	Escherichia coli (E. coli)
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase
KNMI	Koninklijk Nederlands Meteorologisch Instituut
KVE	Kolonievormende Eenheden
LBH	Landbouwhuisdieren
MNLSO	Meetnet Nutriënten Landelijk Specifiek Oppervlaktewater
RWZI	Rioolwaterzuiveringsinstallatie
TBX	Trypton bile X-glucuronide agar

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag