

Monitoringsprogramma *Aspergillus fumigatus* en azolen 2015-2016

Projectteam CLM, Radboud UMC en WUR in samenwerking met opdrachtgever RIVM en expert groep schimmels en azolen.

Concept 23 juni 2015

Inhoud:

1. Achtergrond, doel en werkwijze van de monitoring	1
2. Samenstelling projectteam en expert groep	2
3. Selectie van bronnen ('hot spots')	3
3.1. Aanwezigheid van en gunstige omstandigheden voor <i>Aspergillus fumigatus</i>	4
3.2. Type, gebruik en aanwezigheid van azolen in het milieu	4
3.3. Prioriteren van bronnen	8
4. Monitoring: bemonstering en analyses	9
4.1. Bemonstering	Foot
ut! Bladwijzer niet gedefinieerd.	
4.2. Analyses	9
5. Monsterschema en planning	10

1. Achtergrond, doel en werkwijze van de monitoring

Dit monitoringsprogramma is onderdeel van het onderzoek met betrekking tot azolenresistentie bij de schimmel *Aspergillus fumigatus*.

Dat onderzoek wordt uitgevoerd door RIVM, Radboud UMC, CLM en WUR. Gezien de waargenomen resistentie tegen triazolen bij de schimmel *A. fumigatus* en de gevolgen daarvan voor de behandeling van patiënten met invasieve aspergillose heeft het ministerie van VWS opdracht gegeven de kennislacunes met betrekking tot het ontstaan, de verspreiding en de persistentie van resistente stammen van deze schimmel te onderzoeken. Achterliggend doel is het creëren van een handelingsperspectief ten behoeve van het terugdringen van resistente *Aspergillus*, een duurzaam gebruik van triazolen binnen en buiten de landbouw en behoud van triazolen voor gebruik als geneesmiddel in klinische toepassingen.

De eerste fase van het onderzoek is gericht op drie stappen, te weten selectie, bemonstering en analyse van bronnen ('hot spots'). Deze drie stappen worden als volgt uitgevoerd:

1. **Selectie van bronnen ('hot spots').** Een drietal expert bijeenkomsten zijn georganiseerd om een selectie te maken van bronnen die in stap 2 bemonstering zullen ondergaan. De selectie van bronnen is gebaseerd op de huidige wetenschappelijke inzichten, resultaten van eerdere metingen in het veld en 'expert opinion'. Er wordt getracht contrasterende bronnen te selecteren dwz vergelijkbare bronnen waar een hoge en lage fungicide druk verwacht mag worden. Deze bijeenkomsten leiden tot de selectie van ten hoogste 10 bronnen die bemonstering zullen ondergaan.
Betrokken partijen: opdrachtgever, projectteam en expertgroep.
2. **Bemonstering van bronnen ('hot spots').** Daadwerkelijke metingen zullen worden verricht op ten hoogste 10 bronnen. Zorgvuldige voorbereiding en afstemming met de eigenaren van de locaties zal plaats vinden. Om een goed beeld te krijgen worden op elke bron meerdere (grond)monsters genomen waarvoor, in geval van bijvoorbeeld bodem- of compostbemonstering, de diepte varieert. De monsters zullen worden onderzocht op de aanwezigheid van *A. fumigatus*.
Betrokken partijen: CLM en Radboudumc
3. **Analyse van de monsters.** In de monsters zullen individuele *A. fumigatus* kolonies worden geïdentificeerd en de gevoeligheid voor geselecteerde fungiciden en medische azolen bepaald. De verhouding tussen wild type (gevoelige) en resistente isolaten worden bepaald. Tevens zullen de onderliggende mutaties die geassocieerd zijn met azoolresistentie in kaart worden gebracht. En er zal genetisch onderzoek plaatsvinden naast de fitness van schimmelisolaten afkomstig van contrasterende locaties, genotype en belangrijke compensatoire mutaties bepaald.
Verder zal naast onderzoek aan de schimmel zelf op de meetlocaties ook de aard en concentratie van de fungiciden gemeten worden.
De verschillen tussen de contrasterende locaties zal inzicht geven in welke omstandigheden in belangrijke mate bijdragen aan resistentievorming of het onderhouden ervan.
Betrokken partijen: CLM, Radboudumc en WUR.

2. Samenstelling projectteam en expert groep

Het project wordt uitgevoerd in opdracht van het ministerie van VWS. Het RIVM is gedelegeerd opdrachtgever.

- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)
 - o art. 10.2.e pers. geg.

Het projectteam team bestaat uit:

- Radboudumc
 - o art. 10.2.e pers. geg.
 - o art. 10.2.e pers. geg.
- Centrum voor Landbouw en Milieu (CLM)
 - o art. 10.2.e pers. geg.
 - o art. 10.2.e pers. geg.
- Wageningen University and Research centre (WUR)
 - o art. 10.2.e pers. geg.
 - o art. 10.2.e pers. geg.

Ter ondersteuning is een expertgroep geformeerd vanuit diverse disciplines.

De expertgroep bestaat uit:

- Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist bestrijdingsmiddelen)
- Centrum voor Landbouw en Milieu (CLM)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist veehouderij)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist bestrijdingsmiddelen)
- Wageningen University and Research centre (WUR)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist Aspergillus)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist genetica Aspergillus)
- College Toelating Gewasbeschermingsmiddelen en Biociden (Ctgb)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist azolen, biociden)
- KWR Watercycle Research Institute (KWR)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist Aspergillus en water)
- Universiteit Utrecht, Faculty of Veterinary Medicine (UU)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist schimmels en diergezondheid)
- Centraal Bureau voor Schimmelcultures (CBS)
 - o art. 10.2.e pers. geg. (specialist schimmels)

Naast input van de expertgroep is voor dit monitoringsprogramma gebruik gemaakt van literatuur, bestrijdingsmiddelen data, Ctgb toelatingsbesluiten en contacten met specialisten van bedrijfsleven. Ook de ervaringen uit de KNAW colloquium van 3-5 maart 2015 in Amsterdam zijn gebruikt.

3. Selectie van bronnen ('hot spots')

Om mogelijke bronnen van resistente *A. fumigatus* te identificeren (hot spots) heeft de expertgroep eerst een definitie opgesteld.

Een hot spot is een locatie waar:

- *A. fumigatus* resistentie kan ontwikkelen
- Een hoge selectiedruk bestaat op resistente *A. fumigatus*.
- Waar de meeste genetische diversiteit in *A. fumigatus* wordt aangetroffen (met name ook de seksuele cyclus) en een hoge dichtheid voor kan komen.

De experts komen tot de volgende kenmerken van mogelijke hot spots:

- Aanwezigheid *A. fumigatus*¹
 - o omstandigheden waarbij de schimmel kan groeien:
 - organisch materiaal (*A. fumigatus* is saprofyt)
 - hoge temperaturen (12-65°C, ca. 35°C optimaal, kan >50°C overleven-ascosporen kunnen >70°C overleven)
 - hoge rel. vochtigheid (85-100% is optimaal, bij 30-50% lage groei)
 - zuurgraad (pH 3,7-7,6)
 - specifieke voedingsstoffen (nog onbekend of dit een voorwaarde is voor seksuele voortplanting)
 - o de schimmel moet zich kunnen verspreiden vanuit de hot spot.
- Aanwezigheid azolen, waarbij van belang zijn:
 - o type gebruik (dompelen, spuiten, etc) of aangevoerd via producten
 - o hoeveelheid gebruik (totaal, dosering, frequentie)
 - o concentratie

¹ Kenmerken T, RV en pH toegevoegd door CLM, gebaseerd op: Kwon-Chung (2013) en Shehu & Bello (2011).

- duur van het gebruik
- combinatie van azolen
- metaboliëten.

Belangrijk is om de hele keten te volgen van het materiaal waarop azolen zijn gebruikt en waarop *A. fumigatus* (ergens in die keten) kan groeien (wellicht ook afhankelijk van de levenscyclus van de schimmel). Bijvoorbeeld:

- graan → stro → stal → compost → land
- mais → kuilvoer → stal → mest en melk
- citrusvruchten → schillen in GFT-bak → compost

Selectie van bronnen door het expert team heeft plaatsgevonden op een 5-tal criteria:

1. Er is sprake van azolenaanwezigheid (lage cq hoge concentraties)
2. Er is voldoende substraat aanwezig voor voorkomen en groei voor de volledige levenscyclus
3. Er kan eenvoudig sporenverspreiding plaatsvinden
4. De omstandigheden zijn voldoende vochtig
5. De temperatuur is ideaal voor groei en sporenontwikkeling

Verder kan het ook nodig zijn om bepaalde locaties en materialen te bemonsteren, die niet of slechts beperkt aan alle criteria voldoen. De reden om deze toch mee te nemen is dat er maatschappelijke en/of politieke vragen leven over de rol van deze locaties in ontwikkeling en verspreiding van resistente *A. fumigatus*. Het onderzoek moet kunnen aangeven of de zorgen terecht of onterecht zijn. Denk aan ziekenhuizen en houtverduurzaming.

3.1. Aanwezigheid van en gunstige omstandigheden voor *Aspergillus fumigatus*

A. fumigatus is een saprofyte schimmel die organisch materiaal afbreekt en algemeen voorkomt in het milieu.

De schimmel is alom aanwezig en wordt wereldwijd gevonden, en zou bij voorkeur groeien op plaatsen waar organisch materiaal aanwezig is zoals in een compost hoop. De schimmel kan zich uitbundig asexueel voortplanten. Er bestaat ook een para seksueel en seksueel stadium. De seksuele voortplanting zou een rol kunnen spelen bij het ontstaan van complexe resistentiemechanismen maar dit stadium is tot op heden alleen onder laboratoriumomstandigheden aangetoond en waarschijnlijk weinig frequent aanwezig in het milieu.

3.2. Type, gebruik en aanwezigheid van azolen in het milieu

Azolen hebben een breed scala aan toepassingen ter bestrijding van schimmels. Toepassing vindt o.a. plaats in geneeskunde (mens en dier), in de landbouw (gewasbescherming, conservering), bij houtverduurzaming, in huishoudens (kit en verf), in de bouw (verf, kit), en diverse andere toepassingen (b.v. tentdoek).

De azolen die zijn of worden toegepast en relevant zijn voor dit onderzoek zijn op basis van de expert input en het KNAW colloquium op een rij gezet. Het gaat om:

Tabel 3.1 Triazolën en imazalil

Propiconazool

Bromuconazool (sinds juni 2015 toelating in granen)
Epoxiconazool
Difenoconazool
Tebuconazool
Cyproconazool
Prothioconazool
Metconazool
Penconazool
Imazalil
Prochloraz
Amilsulbrom
Azaconazool (niet meer toegelaten in NL)
Paclbutrazool
Triflumizool
Belangrijkste metaboliet
1,2,4-triazool

Er zijn minstens vijf azolen die in vitro activiteit tonen tegen *A. fumigatus* (geen plant patho-geen) maar inactief zijn tegen stammen die een TR₃₄/L98H resistentiemechanisme hebben. De molecuul structuur van deze azoofungiciden tonen grote overeenkomsten met die van medische triazolen: propiconazool, bromuconazool, epoxiconazool, difenoconazool en tebuconazool. Deze vijf azolen zijn toegelaten in Nederland (Bromuconazool in granen sinds juni 2015)). Ook de fungiciden metconazool en imazalil kunnen actief zijn tegen *A. fumigatus*, en minder actief tegen isolaten met het TR₃₄/L98H resistentiemechanisme. De molecuulformule van beide stoffen is echter minder vergelijkbaar met dat van de medische azolen dan die van de eerder genoemde vijf azolen (Snelders et al. 2009, 2012).

Stensvold et al. (2012) noemen een groter aantal stoffen met een vergelijkbaar werkingsmechanisme: prothioconazool, metconazool, fluquinconazool, hexaconazool, epoxiconazool, difenconazool, tetraconazool, cyproconazool, flusilazool, flutriofol, tebuconazool en propiconazool. De stoffen prothioconazool en cyproconazool zijn ook meegenomen in het onderzoek van Snelders et al., maar de in vitro activiteit tegen *A. fumigatus* bleek relatief laag. Van de door Stensvold genoemde stoffen hebben fluquinconazool, hexaconazool, tetraconazool, flusilazool, en flutriofol geen toelating in Nederland (register toegelaten middelen Ctgb, 15 februari 2015) en ze komen ook niet voor in het register van vervallen middelen.

Ook het fungicide prochloraz heeft een vergelijkbaar werkingsmechanisme.

Samenvattend zijn in Nederland de volgende stoffen toegelaten met een vergelijkbaar werkingsmechanisme: **propiconazool, epoxiconazool, difenoconazool, tebuconazool, bromuconazool, cyproconazool, prothioconazool en metconazool.**

De gebruiksgegevens van de verschillende azolen zijn op een rij gezet.

Gebruiksgegevens **buiten de landbouw** zijn niet of nauwelijks beschikbaar. Schatting volgens Royal Haskoning DHV is dat in Nederland ongeveer 5000 kilo werkzame stof (azolen) per jaar in Nederland wordt toegepast in de houtverduurzaming. Triazolen worden mogelijk ook in kits (sealants) gebruikt. Deze toepassing wordt genoemd in een patent. Er worden geen specifieke triazolen genoemd, voor de kit zelf is een triazool met een functionele zwavelgroep essentieel. Daarnaast is het niet duidelijk of deze stof in deze toepassing ook in Nederland op de markt is. Dit gaat tevens op voor een patent betreffende een schoonmaakmiddel voor koelsystemen en

voor een was/schoonmaakmiddel.

Voor gebruik **in de landbouw** heeft CLM een schatting uitgevoerd op basis van de CBS enquête 2012 met correctie voor de daadwerkelijke afzet (CBS gebruiksgegevens gecorrigeerd obv Nefyto afzetcijfers, factor 1,5 voor fungiciden):

- Het gebruik van azolen is geschat op 130 ton (waarvan 97% in de open teelt en 3% bedekte teelt). Totaal van de 7 genoemde triazolen: 120 ton. (nog excl prochloraz, paclobutrazool en triflumizool)
- Het gebruik van fungiciden in Nederland wordt geschat op ruim 4.000 ton en het gebruik van alle gewasbeschermingsmiddelen op 10.500 ton.

De azolen worden in een groot aantal gewassen toegepast, zoals ook weergegeven in bijlage 1. De azolen prothioconazool, tebuconazool en epoxiconazool worden in de Nederlandse landbouw het meest gebruikt, met name in wintertarwe (tabel 3.2). Verder valt op dat tebuconazool ook veel wordt toegepast in bollen (tulpen en lelies). Epoxiconazool wordt ook toegepast in suikerbieten. Difenconazool en cyproconazool worden vooral gebruikt in suikerbieten. Daarnaast worden imazalil en amisulbrom veel in aardappelen toegepast.

Tabel 3.2 Jaarlijks gebruik triazolen en imazalil in de land- en tuinbouw in Nederland, 2012.

Middel	Areaal met gebruik (ha)	Totaal Gebruik (kg)	Belangrijkste gewassen*
Prothioconazool	152.437	41.118	wintertarwe (48%), tulp bol (11%), zaaiui (10%), lelie bol (9%), zomergerst (5%), zomertarwe (5%)
Tebuconazool	125.319	34.917	wintertarwe (30%), tulp bol (17%), lelie bol (16%), graszaad (9%)
Epoxiconazool	100.573	25.239	wintertarwe (71%), suikerbiet (23%)
Imazalil	17.562	8.591	pootaardappel (88%), tomaat (7%)
Difenconazool	40.390	8.448	suikerbiet (52%), winterpeen (12%), sluitkool (9%), appel (6%), prei (5%)
Cyproconazool	26.415	3.656	suikerbiet (70%), wintertarwe (16%), graszaad (13%)
Propiconazool	3.265	1.695	vaste planten (46%), perkplanten (25%), potplanten (8%), graszaad (7%), bloemkwekerij open grond (6%)
Amisulbrom	6.072	1.116	consumptie-aardappel (100%)
Metconazool	3.075	473	wintertarwe (75%), koolzaad (25%)
Penconazool	3.562	446	appel (19%), rozen (18%), vruchtbomen (16%), aardbeien bedekt (13%), gerbera (12%), peren (11%), aardbeien open grond (9%)

* Alleen gewassen met >5% van het gebruik per stof genoemd.

Bron: CBS 2012 (=meest recente data CBS), met correctie op basis van afzetcijfers.

De toepassing van azolen leidt tot residuen op de gewassen, producten en/of gewasresten. Ze worden in een grote diversiteit in gewasgroepen aangetroffen. De hoogste concentraties bevinden zich in citrusvruchten, hardfruit en kruiden (tabel 3.3). De 3 meest aangetroffen azolen zijn imazalil (citrusvruchten), prochloraz (vruchtgroenten) en propiconazool (citrusvruchten). Voor geïmporteerde producten zijn de aangetroffen azolen veroorzaakt door behandelingen in het land van herkomst, dus buiten Nederland.

Tabel 3.3 gemiddelde residugehalten triazolen en imazalil, per gewas, 2009-2015

Gewasgroepen	AZACONAZOOL	BROMUCONAZOOL	CYPROCONAZOOL	DIFENOCONAZOOL	EPOXICONAZOOL	IMAZALIL	PACLOBUTRAZOOL	PENCONAZOOL	PROCHLORAZ	PROPICONAZOOL	PROTHIOCONAZOOL	TEBUCONAZOOL	TRIFLUMIZOOL	Eindto
▶ Akkerbouwgroenten (knol	0,020		0,011	0,042	0,016	0,041			0,057	0,011	0,030	0,031		0,036
▶ Blad- en stengelgroenten (sla)			0,094	0,207		0,016	0,020		0,056	0,051		0,052	0,020	0,161
▶ Hard-fruit			0,020	0,023		0,935		0,013	0,023	0,025		0,150	0,020	0,539
▶ Koolachtigen en peulvruchten			0,054	0,094	0,020	0,023		0,013	0,100	0,108	0,018	0,059		0,075
▶ Kruiden			0,030	0,329	0,017	0,032	0,020	5,509	0,089	0,129		0,110	0,170	0,289
▶ Overig			0,018	0,293	0,041	0,128		0,058	0,076	0,158		0,078		0,146
▶ Paddenstoelen						0,018			0,032					0,031
▶ Rijst en Granen				0,013	0,016					0,015		0,025		0,019
▶ Tropische en Citrusvruchten		0,210	0,034	0,027	0,023	1,194		0,010	0,380	0,265		0,030		0,924
▶ Vruchtgroenten	0,080	0,020	0,035	0,136	0,031	0,028		0,024	0,722	0,054		0,053	0,027	0,158
▶ Zacht-fruit			0,019	0,045		0,018	0,030	0,042	0,060	0,030	0,010	0,065	0,103	0,052
Eindtotaal	0,050	0,115	0,032	0,109	0,027	1,148	0,023	0,063	0,385	0,125	0,024	0,059	0,030	0,640

3.3. Prioriteren van bronnen

Mede vanuit paragraaf 3.1 en 3.2. is duidelijk dat er diverse bronnen zijn waar *A. fumigatus* voorkomt en groeit en waar ook sprake is van azolendruk. Bij het prioriteren van bronnen is als eerste stap is onderscheid gemaakt tussen sectoren. In de landbouw zijn zowel de **veehouderij** als de **plantenteelt** als mogelijke sectoren aangewezen die een bron kunnen vormen. Buiten de landbouw zijn de **ziekenhuizen** en **behandelde voorwerpen** aangewezen als mogelijke sectoren.

In de **veehouderij** is sprake van gebruik van gewassen of gewasresten die bespoten zijn met azolen en waarin residuen van azolen worden aangetroffen, en waar gewassen worden toegepast in een composterings- of inkuil-procedure. Zo worden granen bespoten en bevat stro dat wordt gebruikt in stallen in de veehouderij azolen. Ook het veevoeder kan azolen bevatten, bijvoorbeeld door het gebruik van azolen in maisteelt. Azolen als fungicide tegen bladvlekkenziekte in mais wordt de laatste jaren sterk gestimuleerd. In de veehouderij is ook sprake van het inkuilen van met name mais en gras. In deze kuilen worden grote hoeveelheden *A. fumigatus* aangetroffen.

Op basis van de 5 criteria (aanwezigheid azolen, optimaal substraat, eenvoudig sporenverspreiding, voldoende vochtigheid, ideale temperatuur) heeft de expertgroep voor de veehouderij de volgende prioritering vastgesteld:

1. Rundveehouderij: hele keten van voerproductie – kuilen – stal – dieren – mest-bierbostel
2. Paardenhouderij: ook de hele keten (veel publieke aandacht)
3. Kalverhouderij, pluimveehouderij, varkenshouderij, geitenhouderij.
4. Kleine huisdieren: papegaaien

Het voorstel van de expertgroep is de rundveehouderij en paardenhouderij te selecteren voor de monitoring. Belangrijk daarbij is de gehele keten te bemonsteren. In beide ketens is het mogelijk contrasterende locaties te bemonsteren (gangbare en biologische keten).

In de **plantenteelt** is ook sprake van gebruik van gewassen en producten die bespoten of behandeld zijn met azolen, waar residuen van azolen worden aangetroffen en waar gewassen of producten worden toegepast in een composteringsprocedure. Zo worden bollen gedompeld in azolen en vindt compostering van pelafval plaats. Een scala aan producten (waaronder citrusvruchten) worden behandeld met azolen. Dit afval wordt in de GFT bak verzameld en komt in de GFT compostering terecht. Fruit wordt behandeld met azolen (dompeling van appels en bespuiting van aardbeien), en op de veiling wordt afgekeurd fruit bewaard in containers. Op basis van de 5 criteria (aanwezigheid azolen, optimaal substraat, eenvoudig sporenverspreiding, voldoende vochtigheid, ideale temperatuur) heeft de expertgroep voor de plantenteelt de volgende prioritering vastgesteld (*in de vorige bijeenkomst is dit onderdeel niet volledig geprioriteerd. onderstaande prioritering nog bespreken in 3^e expertbijeenkomst*):

1. Bollenpelafval: keten van pelafvalhoop tot toepassing op land
2. Groente en fruit-afval: keten van biobak en professionele compostering tot compost
3. Groenafval: composteerbedrijf van ingangsmateriaal tot eindproduct
4. Fruitafval (appels/peren, aardbeien): afvalstroom gedompeld fruit
5. Sierteelt onder glas (potplanten, chrysanthen): grond, biofilm in waterbassin
6. Graszaad/graszodenteelt/grasteelt: afval en hooi
7. Planten van tuincentrum tot vensterbank

8. Champost uit de champignon teelt

Het voorstel van de expertgroep is het Bollenpelafval, Groente en fruit-afval, Groenafval, fruitafval, graszodenafval te selecteren voor de monitoring. Belangrijk daarbij is ook hier de gehele keten te bemonsteren. In de bollenpelafval keten is het mogelijk contasterende locaties te bemonsteren (gangbare en biologische keten). Voor de andere ketens is dit lastiger.

Aan diverse **voorwerpen** worden in het productieproces azolen toegevoegd om schimmelontwikkeling te bestrijden. Ook deze voorwerpen zouden een bron kunnen vormen, al lijken ze in mindere mate aan de 5 criteria te voldoen. De expertgroep heeft de volgende prioritering opgesteld:

1. Houtverduurzaming
2. kit, verf

De expertgroep schat de kans beperkt is dat dit een hotspot is, maar gezien de (publieke) aandacht is het meten wel gewenst.

In **ziekenhuizen** is sprake van patiënten met aspergillosis, regelmatig met de resistente vorm. Azoolmedicatie wordt regelmatig gebruikt om patiënten te behandelen. Ook ziekenhuizen zouden een bron kunnen vormen, al lijken ze in mindere mate aan de 5 criteria te voldoen. Op basis van expert judgement heeft de expertgroep de volgende prioritering opgesteld:

1. Patiënten met Aspergillus kolonisatie – zoals bij CF (hoesten)
2. Luchtmetingen in ziekenhuizen

Veelal wordt aangenomen dat er geen overdracht van mens-mens plaats zal vinden. De expertgroep vindt dat het (toch) nodig is te bepalen of de patiënten daadwerkelijk geen bron van resistente Aspergillus vormen. Verder is bekend dat in ziekenhuizen (evenals o.a. in woningen) de resistente Aspergillus sporen voorkomen in de lucht. Daarom is het voorstel ook luchtmetingen in ziekenhuizen te bemonsteren.

4. Monitoring: Bemonstering en analyses

4.1. Bemonstering

De geselecteerde bronnen worden bemonsterd. Zorgvuldige voorbereiding en afstemming met de eigenaren van de locaties zal plaats vinden. Materiaal wordt bemonsterd Om een goed beeld te krijgen worden op elke bron meerdere monsters genomen waarvoor, in geval van bijvoorbeeld bodem- of compostbemonstering, de diepte varieert. De monsters zullen worden onderzocht op de aanwezigheid van *A. fumigatus*.

4.2. Analyses

Analyses van *A. fumigatus* en testen van de af- en aanwezigheid van resistentie. Primair zal gezocht worden naar *A. fumigatus* (incubatie bij 48°C). Materialen zullen beent worden op agarplaten met of zonder azolen toegevoegd. Individuele *A. fumigatus* kolonies zullen onderzocht worden op fenotype en genotype. Door middel van hitte voorbehandeling zal de aanwezigheid van ascosporen worden aangetoond.

Analyses van de azolen is mogelijk via de uitvoering van het standaardpakket voor bestrijdingsmiddelen, met uitzondering van de metaboliet 1,2,3 triazool. CLM kan de analyses organiseren via het laboratorium van Eurofins. Dit lab heeft uitgebreid ervaring met gecertificeerde metingen in de beoogde matrices. De middelen worden bepaald met LC-MSMS, en waar nodig GC-MSMS.

Het monster wordt gemalen met behulp van een snijmachine. Een deel van het gehomogeniseerde monster wordt ingewogen in een teflon pot. Een gehomogeniseerd deelmonster wordt geëxtraheerd met aceton, gevolgd door extractie met dichloormethaan/petroleumether. Een deel van het extract wordt ingedampd en heropgelost.

Het heroplossen is afhankelijk van de analyse die volgt. Voor de bepaling m.b.v. de GC-MS wordt het monster heropgelost in iso-octaan / toluen (9:1). Voor de bepaling met de LC-MSMS vindt heroplossing plaats in methanol aangezuurd met 0.02% HAC. De werkwijze ter bepaling van het gehalte aan ethefon, dithiocarbamaten en overige single residu methodes staan beschreven in de betreffende werkvoorschriften.

LC-MSMS

De kwantitatieve bepaling van de pesticiden wordt uitgevoerd m.b.v. vloeistofchromatografie-massaspectrometrie (triplequad LC-MSMS) met turbo ion spray ionisatie.

Het gehalte aan pesticiden wordt berekend met behulp van een kalibratielijijn. De identificatie vindt plaats op basis van het multiple reaction monitoring (MRM).

Kwantificering vindt plaats met behulp van de externe standaardmethode.

GC-MSMS

De kwantitatieve bepaling van de pesticiden wordt uitgevoerd m.b.v. capillaire gaschromatografie-massaspectrometrie, GC-MS-TQ (Triple-Quadropole-Detector) in EI mode en gaschromatografie-electron capture detectie, GC-ECD.

De identificatie vindt plaats op basis van 2 massa-overgangen bij GC-MS-TQ en op basis van retentietijd bij GC-ECD en piekvorm.

De residu concentratie van bestrijdingsmiddelen, wordt uitgedrukt in mg/kg, vastgesteld in de Bestrijdingsmiddelenwet "Regeling Residuen van Bestrijdingsmiddelen".

5. Monsterschema en planning

Vanaf augustus 2015 zal bemonstering van 10 bronnen plaatsvinden. Per bron worden de relevante onderdelen bemonsterd en geanalyseerd. Het betreft de volgende bronnen:

1. Rundveehouderij: keten van voer – kuilen – stal – dieren – mest - bierbostel
2. Paardenhouderij: keten van voer – stal – dieren – mest
3. Bollenpelafval: keten van pelafval-pelcompost- compost op perceel
4. Groente en fruit-afval: keten van biobak-compostering -compost
5. Groenafval: keten van ingangsmateriaal-compostering- compost
6. Fruitafval (appels/peren, aardbeien): afval gedompeld fruit
7. Houtverduurzaming keten van verduurzaamd hout
8. kit, verf keten van product-plaats

9. Patiënten met Aspergillus (hoesten)

10. Luchtmetingen in ziekenhuizen

De planning van de bemonstering en analyses in de ketens start vanaf augustus 2015. Voor de bronnen 1-10 worden locaties geselecteerd en afspraken gemaakt t.a.v. de bemonstering. Deelname van bedrijven aan deze bemonstering vraagt zorgvuldige voorbereiding en afstemming.

Om een effectieve bemonstering te realiseren is goed inzicht in de verschillende ketens cruciaal. Voor de bollenpelafvalcompostering is dit inzicht in een tijdlijn op een rij gezet (tabel 3.4.). Vanaf juni start de compostering en bemonstering in de periode juni tot uitrijden is voor de hand liggend.

Tabel 3.4 Reeststromen en compostering tulp
Tulp Restromen en compostering

Materialen periode en hoeveelheid (kg ds/ha/jr)	Azolen	okt	nov	dec	jan	feb	mar	apr	mei	jun	jul	aug	sept	okt	nov	dec
97	gedompekt	restant plantmateriaal														
4760	bespoten in graanteek, en in bolenteek					strodek										
30	bespoten						ziezoekmateriaal									
582	bespoten							bloemresten na koppen		afgestorven loof (blijft op veld)						
pollen, schuim, schaver: 975	gedompekt, bespoten										verwerk ingafval					
68	gedompekt, bespoten													uitschot		
10	gedompekt, bespoten				onbruikbare bollen											
24	gedompekt, bespoten				onverkoopbare bloemen + bol											
17	bespoten				afgesneden stengelresten/bladafval											
574	gedompekt, bespoten				afgebroeide bollen											
?	bespoten				grond											
paarden-, kippen-, rundveestalmest, etc.	zie stromen veshoudrij										mest					
sloot- en bermmaaisel, etc.	-						gras									
snoeihout, boomchors, etc.	-										hout					
Klei kan beter bindend klei/humus complex geven	-										klei					
bacteriepreparaten	-										micro-org.					
Compostering	Kraanmerken	indien nodig materiaal hakselen of kneuzen										opwarming - afkoeling - afrijping -> BEMONSTERING EN ANALYSE				
frozen met compostries (waezen) of onzetten met kraan (grote hoop)	5-15x															
Evt. hoop afdekken	met dek of stro															
temperatuur	50-65C (streven <70C)															
pH	optimaal=5,5-8															
vochtgehalte	optimaal=40-60%															
CO2-gehalte	optimaal=13%															

Bijlage 1: Jaarlijks gebruik van azolen per gewas in Nederland, 2012 (nog zonder prochloraz, triflumizool en paclobutrazool)

Gewas*	Gebruik per ha(kg/ha)	Azolen									
		Propiconazool	Epoxiconazool	Difenoconazool	Tebuconazool	Cyproconazool	Prothioconazool	Metconazool	Penconazool	Amisulbrom	Imazalil
Open teelten											
Lelies (bollen)	1,79				x		x				
Tulpen (bollen)	0,95		x		x	x	x				
Spruitkool	0,84		X	x			x				
Prei	0,81			x	x		x				
Vaste planten open grond	0,62	x		x	x		x				
Narcissen (bollen)	0,41				x		x				
Wintertarwe	0,36		x		x	x	x	x			
Sluitkool	0,30			x	x		x				
Zomertarwe	0,27		x		x		x				
Winterpeen	0,27			x	x						
Graszaad	0,27	x	x		x	x					
Bloemkwek. gewassen open grond	0,27	x	x	x	x		x				
Bos- en haagplantsoen	0,26	x			x				x		
Pootaardappelen	0,20	x		x	x	x	x				x
Zaaiuien	0,20						x				
Suikerbieten	0,18		x	x		x					
Zomergerst	0,14		x		x		x				
Appelen	0,09			x	x				x		
Peren	0,09		x	x	x				x		x
Consumptieaardappelen	0,02				x		x			x	
Zetmeelaardappelen	0,02				x		x				x
Bedekte teelt											
Irissen	2,81				x		x				
Gladiolen	1,43		x		x		x				
Perkplanten	0,95	x									x
Komkommers	0,50				x				x		x
Lelies (snijbloemen)	0,39	x	x		x		x				x
Tomaten	0,38										x
Gerbera s	0,32				x				x		
Rozen	0,32	x							x		x
Aardbeien (bedekte teelt)	0,18								x		
Potplanten - blad	0,14	x			x						
Potplanten - bloei	0,09	x			x						x

* Alleen gewassen met >1% van het totale gebruik in open cq bedekte teelt in NL genoemd.

Bron: CBS 2012 (=meest recente data CBS), met correctie op basis van afzetcijfers.

	Totaalin teelt (kg)		Totaalin teelt (kg)
amisulbrom	1115,8	metconazool	471,9
Consumptie- aardappelen	1115,8	Wintertarwe	351,7
cyproconazool	3655,3	Koolzaad	120,2
Suikerbieten	2554,7	penconazool	444,8
Wintertarwe	601,3	Appelen	84,5
Graszaad	460,4	Rozen	79,4
Tulpen (bollen)	27,2	Vruchtbomen	73,4
Pootaardappelen	11,7	Aardbeien (bedekte teelt)	58,4
difenoconazool	8448,3	Gerbera s	53,1
Suikerbieten	4372,6	propiconazool	1694,6
Winterpeen	999,0	Vaste planten (open teelt)	774,1
Sluitkool	740,1	Perkplanten	417,1
Appelen	512,2	Graszaad	123,8
Prei	435,9	Bloemkwek. gewassen (open teelt)	106,9
epoxiconazool	25238,9	Potplanten - bloei	76,5
Wintertarwe	17967,4	prothioconazool	41117,6
Suikerbieten	5805,4	Wintertarwe	19937,4
Zomertarwe	907,3	Tulpen (bollen)	4709,7
Zomergerst	389,6	Zaaiuien	4176,2
Tulpen (bollen)	102,1	Lelies (bollen)	3583,8
		Zomergerst	2090,9
		tebuconazool	34917,4
		Wintertarwe	10459,0
		Tulpen (bollen)	5800,6
		Lelies (bollen)	5474,0
		Graszaad	3014,9
imazalil	8590,5	Zomertarwe	1369,9
Pootaardappelen	7546,6		
Tomaten	622,5		
Komkommers	304,9		
Rozen	50,2		
Peren	38,8		