

## Verkenning resistentie-ontwikkeling van de schimmel *Aspergillus fumigatus*

### **CLM Onderzoek en Advies**

Ir. A.J. van der Wal

Ir. L. Vlaar

Dr. P.C. Leendertse

### **Radboudumc, Nijmegen**

Prof. dr. P.E. Verweij

Dr. W. Melchers

T. Rijs



**Radboudumc**



Radboudumc

# **Verkenning resistentie-ontwikkeling van de schimmel *Aspergillus fumigatus***

Onderzoek naar condities in de land- en tuinbouw

## **Auteurs**

Ir. A.J. van der Wal, ir. L. Vlaar, dr. P.C. Leendertse – CLM Onderzoek en Advies, Culemborg  
Prof. dr. P. E. Verweij, dr. W. Melchers, T. Rijs – Radboudumc, Nijmegen

## **Mede gefinancierd door**

Stichting Centrum voor Landbouw en Milieu

## **Contactpersonen**

CLM Onderzoek en Advies

art. 10.2.e pers gegevens, Senior projectleider & adviseur

Postbus 62, 4100 AB Culemborg

art. 10.2.e pers. geg.  
[Redacted]

Radboud University Nijmegen Medical Center

art. 10.2.e, persoonsgegevens - Professor of Medical Microbiology

Postbus 9101, 6500 HB Nijmegen

art. 10.2.e pers. geg.  
[Redacted]



# Inhoud

---

<b>1 Inleiding</b>	<b>1</b>
<b>2 Onderzoeksmethode</b>	<b>5</b>
2.1 Conditie en onderzoekslocaties	5
2.1.1 Groencompostering	5
2.1.2 Compostering bloembollenreststromen	10
2.1.3 Potplanten onder glas	12
2.1.4 Stro-productie	13
2.2 Monitoringspakket	14
2.2.1 <i>Aspergillus fumigatus</i>	14
2.2.2 Azoolfungiciden	15
2.3 Monitoringschema	17
<b>3 Resultaten</b>	<b>19</b>
3.1 Analyseresultaten <i>A. fumigatus</i> in groencompostering	19
3.2 Analyseresultaten <i>A. fumigatus</i> in restmateriaal bloembollen	21
3.3 Analyseresultaten <i>A. fumigatus</i> in materiaal kuipplantenteelt	24
3.4 Analyseresultaten <i>A. fumigatus</i> in stro-monsters	24
<b>4 Discussie</b>	<b>27</b>
<b>5 Conclusies en aanbevelingen</b>	<b>31</b>
5.1 Conclusies	31
5.2 Aanbevelingen	32
<b>Bijlage 1 Aanvullende info over bemonsterde stromen en locaties</b>	<b>39</b>



# 1 Inleiding

---

## **Aanleiding**

De schimmel *Aspergillus fumigatus* kan bij de mens verschillende ziekten veroorzaken, variërend van allergische aandoeningen, chronische ziekten en levensbedreigende infecties zoals invasieve aspergillose. De levensbedreigende infecties treden voornamelijk op bij patiënten met een verzwakt immuunsysteem, zoals patiënten met leukemie, orgaantransplantatie en patiënten opgenomen op de intensive care (Latgé 1999). De verwachting is dat het aantal mensen waarbij sprake is van een verzwakt immuunsysteem de komende jaren zal toenemen. Hieraan dragen bij de verbreding van de indicaties voor orgaantransplantatie en de verbeterde overlevingskansen van patiënten met kanker. Patiënten op hogere leeftijd krijgen intensieve behandelingen tegen kanker waarvan bekend is dat het risico op infectieuze complicaties, waaronder invasieve aspergillose, hoger is. Het aantal medicijnklassen dat beschikbaar is voor de behandeling van aspergillusinfecties is beperkt, waarbij de klasse van de azolen de belangrijkste is. Hiertoe behoren 3 middelen met werkzaamheid tegen *A. fumigatus*: itraconazol, voriconazol en posaconazol (Lass-Florl 2011).

*A. fumigatus* komt overal voor. Infecties ontstaan primair via het inademen van sporen. In ziekenhuizen worden steeds vaker infecties gevonden waartegen de azolen niet meer werken. Er zijn sterke aanwijzingen dat de sporen afkomstig zijn van schimmels die buiten het ziekenhuis resistent zijn geworden (Verweij et al. 2009).

De behandeling van mensen die door azoolresistente schimmels geïnfecteerd zijn, is beduidend duurder (duurdere medicijnen, andere toedieningsmethode) en de overlevingskans bij deze infectie is beduidend lager (van der Linden et al. 2011 en 2013).

Voor de humane gezondheid is het dus van belang dat resistentie-ontwikkeling van *A. fumigatus* en blootstelling daaraan wordt voorkomen. Een logische eerste stap is onderzoek naar de plaatsen waar, de wijze waarop en de omstandigheden waaronder *A. fumigatus* resistentie tegen azolen ontwikkelt in het milieu. Schoep en Sterenborg (2013) geven in hun literatuurverkenning aan dat het gebruik van azolen in bestrijdingsmiddelen zou bij kunnen dragen aan een constante selectiedruk, waardoor de resistente stammen voordeel hebben t.o.v. azoolgevoelige stammen. Ze geven ook aan dat het niet bekend is welke toepassing (biocide of gewasbeschermingsmiddel) de hoogste bijdrage leveren aan de selectiedruk. Van der Weijden en van der Wal (2012) maken duidelijk dat ook de land- en tuinbouwsector een mogelijke bron is, vanwege gebruik van azolen als fungicide in diverse gewassen, variërend van potplanten tot graan.

In deze verkenning staat de vraag centraal of en waar resistentie zich in de land- en tuinbouwsector ontwikkelt.

## Probleemstelling<sup>1</sup>

Het Radboudumc doet al enige jaren onderzoek naar het optreden van resistentie van *A. fumigatus* tegen medicijnen uit de azolengroep. De onderzoekers maken zich grote zorgen over deze resistentie-ontwikkeling.

In 2002 concludeerde het Scientific Steering Committee (SSC) van de Europese commissie nog dat resistentie van pathogene schimmels tegen azolen geen gezondheidsprobleem vormde. Dit omdat de frequentie van resistentie niet verder toenam en omdat in de humane gezondheidszorg geen stammen gevonden waren die in de agrarische sector resistent waren geworden. Dit onderzoek richtte zich primair op gisten, zoals *Candida*, en niet op de saprofytaire schimmels zoals *Aspergillus*. Deze conclusie wordt echter ontkracht door de ontwikkelingen en inzichten die nadien zijn opgedaan.

Bekend was dat azoolresistentie in *A. fumigatus* kon ontstaan door behandeling met azolen. Het onderzoek vanuit het Radboudumc gaf aan dat er een tweede route bestond, namelijk resistentievorming in het milieu. Mutaties die gevonden werden in klinische isolaten werden ook teruggevonden in het milieu, en genetisch onderzoek toonde aan dat de patiënt- en omgevingsresistente stammen aan elkaar verwant waren. Vervolgonderzoek identificeerde vijf fungiciden (bromuconazol, tebuconazol, epoxiconazol, difenoconazol en propiconazol) die in vitro actief waren tegen *A. fumigatus* (wat geen plantpathogene schimmel is) en waarvan de molecuul structuur sterk leek op dat van de medische azolen (Snelders et al. 2009 en 2012). De huidige gedachte is dat *A. fumigatus* in het milieu blootstaat aan deze fungiciden en mutaties ontwikkelt waardoor deze fungiciden niet meer werkzaam zijn. Patiënten ademen azool-gevoelige en resistente sporen in en ontwikkelen azoolresistente aspergillusziekte. De medische azolen blijken dan niet meer werkzaam omdat de hun molecuulstructuur sterkt lijkt op dat van de fungiciden. De mate waarin resistentie optreedt neemt de laatste jaren snel toe (inmiddels blijkt ruim 5% van de *A. fumigatus* schimmels azoolresistent). De eerste 'omgevings'-mutatie (TR<sub>34</sub>/L98H) is ontdekt in Nederland, in 1998, en wordt nu in vele Europese en Aziatische landen gevonden. In 2009 werd een nieuwe derde 'omgevings'-mutatie gevonden (TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A), die zich eveneens snel verspreid heeft in Europa en o.a. India.

Belangrijk is om inzicht te krijgen in de wijze waarop de *A. fumigatus* schimmel resistent wordt in het milieu. Hieromtrent zijn er twee belangrijke concepten:

1. Blootstelling van de *A. fumigatus* schimmel aan een hoge concentratie van de fungicide zou een belangrijke voorwaarde zijn om resistent te kunnen worden. Dit zou betekenen dat bepaalde toepassingen waarbij hoge concentraties worden gebruikt het risico zouden verhogen. Genoemde voorbeelden zijn het dompelen van bollen en verduurzaming van hout (Gisi, 2013).
2. De samenstelling en variatie in de 'omgevings'-mutaties zouden er mogelijk op wijzen dat resistentievorming plaatsvindt via de zgn. seksuele reproductie van *A. fumigatus*. De *A. fumigatus* schimmel heeft een uitbundige asexuele reproductie waarbij miljarden sporen geproduceerd worden en verspreid. De seksuele reproductie werd pas in 2009 ontdekt en uitsluitend onder laboratoriumomstandigheden (Dyer & Paoletti, 2005). Seksuele reproductie wordt gezien als belangrijk voor de lange-termijnoverleving van de schimmel en zou meer complexere genetische veranderingen toelaten, zoals de 'omgevings'-resistentie mutatie. De seksuele reproductie vindt zeer moeizaam plaats en

---

<sup>1</sup> Bronnen: Kleinkauf et al 2013, Vermeulen et al 2012, Van der Linden et al 2011, Advies aan LNV, VROM en VWS 2010, Verweij et al 2008).

vereist bepaalde nutriënten, een constante hoge temperatuur (30°C) en een donkere omgeving. In deze (laboratorium) omstandigheden kunnen seksuele sporen gevonden worden na 10 tot 12 weken.

Gezien de tot nu toe verworven inzichten, lijken er ook in de landbouw condities te zijn waaronder *A. fumigatus* resistentie kan ontwikkelen (Kleinkauf et al. 2013, Verweij et al. 2008, Gisi 2013). Mogelijke condities zijn bijvoorbeeld de teelt onder glas, de groencompostering en de bollenteelt. Met name de hoge temperatuur die in deze situaties kan ontstaan en het feit dat er 'azoldruk' is, rechtvaardigen nader onderzoek. Ook de (neven)productie van stro in de graanteelt zou een risico kunnen vormen, vanwege het azoolgebruik in granen. Hoge temperaturen komen niet voor in de teelt, maar stro kent vervolgtoeepassingen waarbij de temperaturen kunnen oplopen tot boven de 30°C graden.

### **Doelstelling en afbakening onderzoek**

CLM en Radboudumc hebben initiatief genomen voor een kleinschalig, verkennend onderzoek. Het doel daarvan is om te bepalen of *A. fumigatus* onder de condities die optreden in de glastuinbouw, de groencompostering, de bollenteelt en de graanteelt, azoolresistentie kan ontwikkelen.

Het onderzoek richt zich op de mogelijke ontwikkeling van resistentie in deze sectoren in Nederland. Blootstelling van mensen aan de schimmel of de sporen daarvan is geen onderdeel van dit onderzoek.

### **Verkenning!**

Het onderzoek is verkennend en kleinschalig van omvang. De gevonden resultaten zijn slechts indicatie die de opzet van een groter, wetenschappelijk onderzoek ondersteunen.

### **Onderzoeksvragen**

In deze rapportage proberen we antwoord te geven op de volgende vragen:

1. Waar en wanneer komen er in de glastuinbouw, de groencompostering, de bollenteelt en de graanteelt omstandigheden voor waarin *A. fumigatus* resistentie kan ontwikkelen?
2. Worden er in monsters die genomen zijn in deze omstandigheden azolen en resistente schimmels aangetroffen?
3. Welk nader onderzoek is nodig? Bijvoorbeeld: is het nodig ook andere omstandigheden te onderzoeken? En: op welke manier kan worden voorkomen dat resistentie optreedt?

### **Leeswijzer**

Het volgende hoofdstuk geeft een beschrijving van de onderzoeksmethode en de condities die onderzocht zijn. In hoofdstuk 3 worden de resultaten beschreven. Hoofdstuk 4 bevat de discussie en in hoofdstuk 5 geven we conclusies en aanbevelingen.





# 2 Onderzoeksmethode

---

Het onderzoek bestond uit verschillende stappen:

1. Bepalen op welke plekken zich condities voordoen waar resistentie kan optreden in de glastuinbouw, groencompostering, bollen- en graanteelt: literatuuronderzoek, gesprekken met teelt/composteringsdeskundigen.
2. Vaststellen monitoringspakket: te bemonsteren materialen, fungiciden, condities.
3. Keuze van bemonsteringslocaties, benaderen bedrijven, coördineren bemonstering.
4. Analyse van de monsters: kweken op de aanwezigheid van azoolresistente *A. fumigatus* en analyse van het onderliggende resistentiemechanisme. Ook het type sporen is geanalyseerd (namelijk ontstaan uit een seksuele of asexuele cyclus).

## 2.1 Condities en onderzoekslocaties

Aspergillus is een saprofytaire schimmel die van nature groeit op rottend of dood organisch materiaal. De asexuele sporen verspreiden zich in grote getale en makkelijk door de lucht, zowel in het buitenmilieu als binnenshuis.

Condities die voor *A. fumigatus* geschikt lijken om azool-resistentie te ontwikkelen zijn:

- aanwezigheid van complementaire *A. fumigatus* – mating types;
- temperatuur van ca. 30°C, gedurende 6-8 weken;
- aanwezigheid van azool-fungiciden;
- aerobe condities.

Er is gekozen voor vier sectoren waar genoemde condities voorkomen, namelijk:

- groencompostering;
- compostering op bollenteeltbedrijven;
- potplanten onder glas;
- stro, als bijproduct van de graanteelt.

In de paragrafen hieronder geven we daarvan een beschrijving. In bijlage 1 is een uitgebreidere beschrijving gegeven van de processen in de teelt en compostering en de materialen die zijn bemonsterd.

### 2.1.1 Groencompostering

#### Algemene beschrijving van de sector

##### Compostering

Groenafval is een verzameling plantaardige afvalstoffen die vrijkomen bij de aanleg en het onderhoud van particulier en openbaar groen, bos- en natuurterreinen en watergangen. Bermmaaisel is groenafval dat vrijkomt bij het maaien van groenstroken en wegbermen. Snoeihout is groenafval dat vrijkomt bij het snoeien van

bomen, struiken in particulier en openbaar groen, bos en natuurterrein. De hoeveelheid groenafval in Nederland wordt geraamd op ca. 3.200.000 ton per jaar, vooral bestaande uit plantsoenafval en slootmaaisel.

### **Box 2.1. Composteringsmaterialen**

#### Agrarisch afval

Plantaardig afval van land- en tuinbouwbedrijven dat vrijkomt bij de agrarische bedrijfsvoering niet zijnde de beoogde producten zoals knollen, bollen, vruchten en dergelijke.

#### Bermmaaisel

Plantaardig afval dat vrijkomt bij het maaien van bermen en taluds.

#### Gescheiden ingezameld groenafval

Gescheiden ingezameld groenafval komt vrij bij de aanleg en onderhoud van openbaar groen, bos- en natuurterreinen. Het betreft tevens afval dat hiermee te vergelijken is, zoals grof tuinafval, berm- en slootmaaisel, afval van hoveniersbedrijven, agrarisch afval en afval dat vrijkomt bij aanleg en onderhoud van terreinen van instellingen en bedrijven.

#### Gescheiden ingezameld organisch bedrijfsafval

Gescheiden ingezameld organisch bedrijfsafval, waaronder (gekookt) keukenafval en etensresten (*swill*) dat naar aard en samenstelling vergelijkbaar is met gescheiden ingezameld GFT-afval en vrijkomt bij handel, diensten, overheden en veilingen.

#### Slootmaaisel

Plantaardig afval dat vrijkomt bij onderhoudswerkzaamheden aan sloten, vijvers en andere (kleine) watergangen. De onderhoudswerkzaamheden kunnen bestaan uit het maaien van waterkanten en het snoeien van begroeiing in de watergangen om het dichtgroeien te voorkomen.

#### Structuurmateriaal

(Grotendeels) houtachtig materiaal, zoals takken, stobben en stammen, dat wordt toegevoegd om een zo optimaal mogelijk composteerproces te bewerkstelligen.

Composteren is een proces waarbij biodegradeerbaar materiaal onder gecontroleerde omstandigheden en onder aerobe condities (dat wil zeggen aanwezigheid van zuurstof), door micro-organismen wordt afgebroken en omgezet tot een homogeen en eindproduct dat zodanig stabiel is dat daarin alleen nog een langzame afbraak van humeuze verbindingen plaatsvindt en dat niet mede bestaat uit dierlijke meststoffen.

Het composteringsproces van groenafval vindt plaats in de open lucht. Het aangevoerde afval wordt opgeslagen en vervolgens verkleind. Bij aanvoer van grote hoeveelheden gras wordt het voor langere tijd ingekuuld om in najaar en winter geleidelijk verwerkt te worden. Het verkleinde materiaal wordt direct als eindproduct toegepast of het wordt gecomposteerd. Voor het composteren wordt het materiaal op hopen gezet die de vorm van een rug of een plateau kunnen hebben. Tijdens het composteringsproces wordt het materiaal een aantal malen omgezet. Dat kan gebeuren met speciale omzetmachines, of met een shovel of hydraulische kraan. De frequentie van omzetten kan variëren van gemiddeld 1x per week tot

gemiddeld 1x per vier weken. In de beginfase wordt meestal frequenter omgezet dan in een latere fase (zie box 2.2.). De frequentie is afhankelijk van de porositeit van het composterende materiaal en van de snelheid waarmee de porositeit terugloopt door het inzakken van de hoop. Na een composteringsproces dat 10 tot 26 weken duurt, worden de grove delen uit de compost gezeefd. De grove fractie gaat opnieuw de compostering in, of kan op een andere manier worden ingezet, bijvoorbeeld als biomassa in een energiecentrale of als biofiltermateriaal.

### **Box 2.2. Typen composteringsmethoden**

#### Intensieve methode met hoge omzetsfrequentie

In de eerste twee weken wordt intensief omgezet (circa drie maal). Met het vorderen van het composteringsproces neemt de omzetsfrequentie af naar gemiddeld één maal per drie weken. Het composteerproces duurt gemiddeld drie maanden. In deze periode wordt totaal circa zeven maal omgezet.

#### Conventionele methode

Bij deze methode wordt omgezet met behulp van bijvoorbeeld shovels of kranen. Er wordt ongeveer één maal per vier weken omgezet. Het composteerproces duurt gemiddeld zes maanden.

#### Intensieve methode met geforceerde beluchting

Door het composterende materiaal wordt met behulp van een ventilator en via een buizensysteem lucht geblazen. Er wordt in totaal circa vijf maal omgezet met een omzetmachine. Het composteerproces duurt circa twee-en-een-half tot drie maanden.

### Composteringscondities

De kans is groot dat in de ingangsstromen voor groencompost zowel sporen van *A. fumigatus* als sporen van relevante azoofungiciden aanwezig zijn, gezien de combinatie van type biomassa, aerobe condities en temperatuur. In de ingangsstromen zoals boven beschreven, kunnen sporen van azolen voorkomen die in de boomteelt, openbaar groen en door consumenten gebruikt worden.

Belangrijke procesparameters bij compostering zijn: het zuurstofgehalte, het vochtgehalte, de structuur (porositeit), de temperatuur, de C/N<sup>2</sup> verhouding en de pH van het te composteren materiaal. Procesparameters kunnen worden gebruikt om het composteerproces actief te sturen, dan wel om het verloop ervan te volgen. Door deze parameters te meten, kan een beeld worden verkregen van de condities waaronder azoolresistente *A. fumigatus* stammen kunnen ontstaan.

### Kans op aanwezigheid van fungiciden

Fungiciden kunnen, afhankelijk van de herkomst, aanwezig zijn in het plantaardige materiaal als ingangsstromen. Toegelaten azoofungiciden die zijn toegelaten in openbaar groen, sport- en golfterreinen zijn: metconazool, prothioconazool en tebuconazool.

---

<sup>2</sup> De C/N is een verhouding die de hoeveelheid (als massa) koolstof ten opzichte van stikstof in een bepaalde verbinding of monster weergeeft.

### Monitoringslocaties en -materiaal

In de groencompostering zijn zowel ingangsstromen als (blad, gras en houtige stromen) als de materialen uit de verschillende fasen in het composteringsproces bemonsterd.

De monitoring heeft plaatsgevonden op een groot en gespecialiseerd composteringsbedrijf. In bijlage 1 zijn de verschillende stappen van het proces in detail beschreven. Keuze van de bemonsteringsmaterialen en -omstandigheden en de resultaten zijn besproken met specialisten (compostering, microbiologie) van het compostbedrijf.

Voor de groencompostering zijn op 17 juli 2013 vijf fasen bemonsterd (tabel 2.1).

**Tabel 2.1 Bemonsterde materiaal/stromen in een groencomposteringsproces op monsternameronde 1, 17 juli 2013.**

Nr.	Materiaal
<b>1<sup>e</sup> fase: Ingangsmateriaal</b>	
1	Houtsnippers (ingang)
2	Kienhout (ingang) RHP compost
3	Zeefgrond (ingang)
4	Gras (ingang)
5	Blad (ingang)
6	Zeefoverloop
<b>2<sup>e</sup> fase: Ril</b>	
7	Rail batch RHP 258 1 dag oud
8	Rail batch RHP 245 3 dagen oud
<b>3<sup>e</sup> fase: Tafel</b>	
9	Tafel batch 257, 10 dagen oud
10	Tafel batch 256, 20 dagen oud
11	Tafel batch 255, 30 dagen oud
12	Tafel batch 254, 40 dagen oud RHP
13	Tafel batch 253, 50 dagen oud
<b>4<sup>e</sup> fase: Narijping</b>	
14	Narijping
<b>5<sup>e</sup> fase: Eindfase</b>	
15	Schimmeldominante mulch
16	Groencompost
17	Schimmeldominante humuscompost
18	RHP compost batch 252

Op 9 oktober 2013 zijn in de groencompostering opnieuw verschillende fasen bemonsterd (tabel 2.2).

**Tabel 2.2 Bemonsterde materiaal/stromen in een groencomposteringsproces op monsternameronde 2, 9 oktober 2013.**

Nr.	Materiaal	Temperatuur °C	CO2 %
<b>1° fase: Ingangsmateriaal</b>			
44	Bladmonster oppervlak		
45	Bladmonster 30 cm	26	5,5
46	Houtsnippers ingang oppervlak		
47	Houtsnippers ingang 30 cm	21	0
48	Ingekuild gras oppervlak		
49	Ingekuild gras 30 cm	53	20+
50	Kienhout oppervlak		
51	Kienhout 30 cm	20	0
52	Zeefgrond oppervlak		
53	Zeefgrond 30 cm	54-58	18,5
54	Zeefoverloop opp.		
55	Zeefoverloop 30 cm	17-18	0
<b>2° fase: Ril</b>			
56	1x omgezette ril, batch 264, 0 dagen oud oppervlak		
57	1x omgezette ril, batch 264, 0 dagen oud 30 cm	33-37	15
<b>3° fase: Tafel</b>			
58	Batch 263 (tafel) 27-9-2013 oppervlak		
59	Batch 263 (tafel) 27-9-2013 30 cm	27-34	5
60	Batch 263 (tafel) 27-9-2013 50 cm	45-52	15
61	Batch 260 (tafel) 20-8-2013 oppervlak		
62	Batch 260 (tafel) 20-8-2013 30 cm	40	0
63	Batch 260 (tafel) 20-8-2013 50 cm	64	0
<b>4° fase: Narijping</b>			
64	Narijping midden hoop eco oppervlak		
65	Narijping midden hoop eco 30 cm (bij groter diepte geen hogere temperatuur)	44	14
<b>5° fase: Eindfase</b>			
66	Groencompost 0-15 mm eindproduct oppervlak		
67	Groencompost 0-15 mm eindproduct 30 cm	37-41	8
68	Groencompost 0-15 mm eindproduct 50 cm	48	16,5
69	Compostthee vloeibaar tank 2	-	-

Op 9 oktober is er voor gekozen om op 2 diepten te bemonsteren omdat de temperatuurgradiënt in de voorraden materiaal vrij steil is. De buitentemperatuur tijdens de bemonstering was 16 graden Celsius. Dit is ook als temperatuur voor de oppervlakte monsters genomen. Naast de temperatuur is via een CO<sub>2</sub> meting ook een vrij grove indicatie verkregen van het zuurstofgehalte op de monsterpunten. *A. fumigatus* is een aerobe schimmel maar kan wel bij lage zuurstofconcentraties groeien (afhankelijk van het medium tot O<sub>2</sub> concentraties van 0,1%). Dit ligt onder de zuurstofspanningen die hier zijn gemeten, dus groei in alle monsters zou qua zuurstofspanning mogelijk moeten zijn.

Ascosporen worden verwacht onder suboptimale condities (hoog CO<sub>2</sub>-gehalte – dus weinig zuurstof en diep in de hoop).

## 2.1.2 Compostering bloembollenreststromen

### Algemene beschrijving van de sector

#### Teelt

De bloembollensector betreft de teelt van bloembollen met de bol als eindproduct. Een groot deel van het areaal is in handen van gespecialiseerde bloembollenbedrijven. Een deel van de bollen wordt als eindproduct geteeld en een ander deel dient als uitgangsmateriaal voor een volgend teeltseizoen. Bollen worden geteeld voor zowel de droogverkoop (bol) als de broeierij (bloem).

De belangrijkste bolgewassen in Nederland zijn tulp, lelie, hyacint, narcis, gladiool, krokus en iris. Een deel van de bollenteelt vindt plaats in de bekende bloembollengebieden: Bollenstreek, Noordelijk Zandgebied en Kennemerland. Hier is sprake van gespecialiseerde teelt met een vruchtwisseling op zeezandgronden. Een ander, groeiend deel van de bloembollenproductie vindt plaats in de vorm van de 'reizende bollenkraam'. Dat wil zeggen dat de bollen in een ruim vruchtwisselingschema met niet-bolgewassen, jaarlijks op een ander stuk land geteeld worden. In onder meer West-Friesland, Zeeland en Flevoland (voornamelijk tulp), Drenthe, Overijssel en Limburg (voornamelijk lelie) is hiervan sprake. Teelt vindt veelal plaats in akkerbouw-rotaties of op gehuurd land van veehouders.

In 2013 werden in totaal op 23.290 hectare bloembollen geteeld in Nederland, waarvan 11.350 ha tulpen. De biologische bollenteelt omvat slechts 20 hectare (<0,1%).

#### Compostering

Op een bloembollenbedrijf worden soms stro, lof en pelafval gecomposteerd. Door het omzetten van deze reststromen ontstaat broei, waarbij de temperatuur kan oplopen tot 68 graden Celsius. Hierdoor zijn na ongeveer drie weken alle ziektes in het afval geliquideerd. Door het regelmatig omzetten is de compost na zes tot acht weken klaar om over het land te worden verstrooid. Het omzetten vindt veelal plaats op het eigen bedrijf van de betrokken bloembollenkweker.

#### Composteringscondities

Door in de bloembollenteelt vrijkomende gewasresten te composteren, kunnen de genoemde condities ontstaan waarbij er azool-resistentie bij *A. fumigatus* kan optreden.

#### Kans op aanwezigheid van fungiciden

In de conventionele bollenteelt zijn enkele azoolfungiciden toegelaten. Het betreft prothioconazool en tebuconazool. Ter illustratie: een inschatting op basis van CBS-gegevens (2008, recentere gegevens ontbreken) is dat het totale gebruik van azolen ligt op ca. 5300 kilo in de tulpenteelt (zie ook tabel 2.8). Dit komt neer op een gemiddeld gebruik van 0,5 kg/ha.

Het gebruik in de bollenteelt kent twee type toepassingen. De azolen worden, net als in veel andere gewassen, gebruikt als gewasbespuiting. Daarnaast worden ze ook toegepast bij de bolontsmetting voorafgaand aan de teelt. Het middel wordt dan toegevoegd aan een bad met water en bestrijdingsmiddel, waarin de bollen gedompeld worden (andere methoden van bolontsmetting zijn schuimen en douchen). De concentraties waaraan de bollen worden blootgesteld bij de bolontsmetting zijn hoog in relatie tot die bij de gewasbehandeling. Binnen de landbouw zou dit mogelijk de toepassing kunnen zijn met de hoogste azooldruk.

### Monitoringslocaties en -materiaal

In de bloembollenteelt is materiaal bemonsterd dat direct met azolen in contact is gekomen en waarin de kans dat *A. fumigatus* aangetroffen kan worden aanzienlijk werd geacht. Dit zijn pelafval (vellen die van de bol worden gehaald na de oogst) en materiaal dat vrijkomt bij de broei (teelt van bloemen uit de bol) en dat gecomposteerd wordt.

De monitoring heeft plaatsgevonden op een gangbaar en op een biologisch bedrijf, dat als referentie diende. Beide bedrijven telen tulpen. Op het gangbare bedrijf zijn monsters genomen van het pelafval en het broeiafval van tulpen en de compost. Op het biologische bedrijf is alleen tulpen-pelafval bemonsterd. Ook is ter vergelijking een monster genomen van tulpenbollen uit de consumentenverkoop (op Schiphol).

Bemonstering van kopafval (de bloem die van de steel wordt gehaald ter bevordering van de bolontwikkeling) zou ook interessant zijn geweest, maar dit was niet realiseerbaar, omdat dit alleen in het voorjaar (vers) beschikbaar is.

Er zijn op 19 juli 2013 vijf fases bemonsterd (tabel 2.3).

**Tabel 2.3 Bemonsterde materiaal/stromen bij een gangbaar telend bloembollenbedrijf (teelt en broei) en een zakje tulpenbollen in monsternummer 1, 19 juli 2013.**

Nr.	Materiaal
19	Tulpenbroei afval: oppervlak hoop
20	Tulpenbroei afval 5 cm diep
21	Tulpenbroei afval 10 cm diep
22	Pelafval
29	Tulpenbollen, aangeschaft op Schiphol

Het afvalmateriaal was relatief droog en is bij droog, zonnig weer bemonsterd. Het materiaal heeft nog niet heel lang op de composteerplaats gelegen, met name het pelafval niet.

In oktober 2013 is nog een aantal monsters van bloembollenafval geanalyseerd (tabel 2.4).

**Tabel 2.4 Bemonsterde materiaal/stromen bij een gangbaar telend bloembollenbedrijf (teelt en broei) en bij een biologisch bloembollenbedrijf in monsternummer 2, oktober 2013.**

Nr.	Materiaal
30	Pelafval biologische bollen (droog materiaal)
33	Vers(er) pelafval
34	Pelafval oppervlak
35	Pelafval 10 cm diepte
36	Pelafval 20 cm diepte
37	Compost oppervlak
38	Compost 20 cm diepte



Voor de bemonstering was er veel regen gevallen. De materialen waren nat. Het is niet bekend of er in de tussentijd nieuw materiaal op de hopen is gebracht, maar er leek wel vers materiaal aangevoerd te zijn.

### **2.1.3 Potplanten onder glas**

#### **Algemene beschrijving van de sector**

##### Teelt

De potplantenteelt (inclusief kuipplanten) is een sector waarin een breed pallet aan groene en bloeiende planten wordt geteeld. De teeltduur kan sterk variëren, naar gelang het type plant. Ook verschillen de teelten van dit brede pallet in type substraat, manier van water geven, lichtregime, vochtregime etc. Chemische gewasbescherming kan op verschillende manieren plaatsvinden: gewasbehandeling, ruimtebehandeling, druppelen. Daarnaast wordt gebruik gemaakt van fysische en biologische bestrijdingsmethoden.

In 2013 werd in Nederland 1300 hectare potplanten onder glas geteeld. Het aandeel biologisch is beperkt.

##### Teeltcondities

Sommige soorten zijn relatief warmteminnend waar andere soorten relatief wat koeler geteeld kunnen worden. Mediterrane en tropische kuipplanten worden wat warmer geteeld. Veelal wordt er gebruik gemaakt van substraten. Dit zijn met name potgrondmengsels, waarbij mengsels mogelijk zijn met o.a. met perliet, kokos en klei.

De teeltduur verschilt afhankelijk van het gewas(stadium), het jaargetijde en potmaat en varieert van enkele weken tot een jaar.

##### Fungicidegebruik

In de potplantenteelt wordt bij bepaalde planten het middel Tilt 250 EC gebruikt, met de werkzame stof propiconazool. Deze stof kan worden ingezet in de volgende soorten: Anisodonteia, Azalea, Bellis, bolchrysanthe, Bougainvillea, Campanula, Cassia (Senna), Celosia, Cestrum, Cineraria, Euphorbia, Fatsia, Gardenia, Heliotropium, herfstaster (Aster novi-belgii), Hortensia, Kalanchoë, klimplanten (Clematis), klimplant (Hedera), Lantana, Osteospermum, Pelargonium, Petunia, potanjer, potchrysanthe, potgerbera, Primula, Ranunculus, Salvia, sierkolen, Solanum, Tagetes, violen en zonnebloem.

Een inschatting op basis van de meest recent CBS-gegevens (2008) is dat het totale gebruik van azolen in de potplanten ligt op ca. 40 kilo werkzame stof, wat neer komt op een gemiddeld gebruik van 0,03 kg/ha. Dit is relatief weinig ten opzichte van het totale landelijke gebruik (zie ook tabel 2.8).

#### **Monitoringslocaties en -materiaal**

In dit project is gekozen voor monitoring op een gangbaar kuipplantenbedrijf. Hier zijn monsters genomen in de teelt van de potplantensoorten Lantana en Solanum. Monsters zijn genomen van het teeltsubstraat (potgrond) en van het water uit het eb- en vloedsysteem dat zorgt voor de watervoorziening van de planten.

Het was de bedoeling ook te bemonsteren bij een biologische teler. Dit is echter niet gelukt, omdat er geen glastuinbouwbedrijf gevonden kon worden met biologische teelt van kuipplanten. Om toch een referentie te hebben, zijn er op het gangbare bedrijf monsters genomen in planten waarin wel azoolfungiciden zijn ge-

bruikt (de Lantana's) en in planten waarin deze middelen niet zijn gebruikt (de Solanumsoort). Deze soorten staan echter wel in dezelfde kascompartimenten en eb-vloed systemen, dus zijn niet geheel onafhankelijk.

Op 19 juli 2013 is er bemonsterd bij het kuipplantenbedrijf (tabel 2.5). Hierbij is potgrond van een aantal planten in pot genomen, zowel onder uit de pot als aan het oppervlak. Er is 1 watermonster van het eb-vloed systeem genomen. Het materiaal was redelijk droog tot matig vochtig bij bemonstering. Het vochtgehalte is niet bepaald.

**Tabel 2.5 Bemonsterde materiaal/stromen bij een gangbaar telend kuipplantenbedrijf in monsternameronde 1, 19 juli 2013.**

Nr.	Materiaal
23	Lantana potgrond (onder aan wortelkluit)
24	Lantana geel/wit potgrond (onder aan wortelkluit)
25	Lantana geel potgrond (onder aan wortelkluit)
26	Lantana geel/wit (oppervlak potgrond)
27	Solanum wit, geen Tilt gebruikt
28	Watermonster eb-vloed vloer

#### **2.1.4 Stro-productie**

##### **Algemene beschrijving van de sector**

###### Teelt

Stro is een bijproduct van de graanteelt. Granen groeien buiten in de vollegrond en zijn vaak onderdeel van een akkerbouwteeltplan. Ze worden in alle Nederlandse akkerbouwgebieden geteeld.

In Nederland werd in 2013 in totaal op 188.780 ha granen geteeld, waarvan:

- 152.750 ha tarwe;
- 29.620 ha gerst;
- 1.950 ha triticale;
- 1.820 ha rogge;
- 1.890 ha haver.

Op circa 2% van het areaal wordt biologisch geteeld.

Binnen de granen wordt onderscheid gemaakt tussen winter- en zomergranen. Wintergranen worden gezaaid tussen half september en begin februari en eind juli of in augustus geoogst. Zomergranen worden tussen eind maart en begin mei gezaaid en eveneens in augustus geoogst. De graankorrels en het stro worden apart geoogst, in dezelfde werkgang. Telers kunnen het stro gebruiken als bodemverbeteraar, door het in de grond onder te werken. Vaak (zeker als de stroprijs goed is) wordt het stro in balen geperst en dan verkocht. Stro kent vele toepassingen, bijvoorbeeld in hokken en stallen voor vee maar ook als afdekmiddel in de bollenteelt en de vollegronds aardbeienteelt.

###### Teeltcondities

In de graanteelt komen geen hoge temperaturen voor. Dit betekent dat niet alle in 2.1 genoemde condities voor kunnen komen. Maar in de toepassingen van stro, verderop in de keten, zouden hogere temperaturen wel kunnen voorkomen.

### Kans op aanwezigheid van fungiciden

Het totale landelijke gebruik van azoalfungiciden in de teelt van granen is, mede door het grote areaal, hoog. Ter illustratie: een inschatting op basis van de meest recente CBS-gegevens (2008) is dat het totale gebruik ligt op ca. 32.500 kilo in winter- en zomertarwe (zie ook tabel 2.8). Dit komt neer op gemiddeld ca. 0,2 kg/ha. Sinds 2008 zijn verschillende nieuwe middelen met (bestaande) azolen op de markt gekomen.

In de graanteelt besteden fabrikanten, handel en telers al veel aandacht aan het toenemende risico van resistentie van schimmels tegen azolen. Telers wordt geadviseerd verschillende fungiciden te combineren en af te wisselen.

De volgende azolen zijn toegelaten in graangewassen: cyproconazool, epoxiconazool, metconazool, propiconazool, prothioconazool en tebuconazool.

### **Monitoringslocaties en -materiaal**

Monsters zijn genomen van het stro op het moment dat dit in balen geperst was en maximaal 2-3 maanden in opslag had gelegen. Er is stro bemonsterd van 5 verschillende bedrijven, waarvan 3 gangbare (tarwestro) en 2 biologische bedrijven (1 tarwestro en 1 roggestro).

In totaal zijn er 5 stromonsters geanalyseerd op *A. fumigatus* (tabel 2.6). Het bemonsterde materiaal was droog en lag nog niet lang in opslag. Het vochtgehalte is niet bepaald. Waarschijnlijk is al het stro onder droge optimale condities van het land gehaald, gezien het weer in de zomer van 2013.

**Tabel 2.6. Bemonsterde materiaal/stromen aan stro (gangbaar en biologisch).**

Nr.	Materiaal
31	Teler 1 gangbaar stro (wat donkerder)
32	Teler 2 gangbaar stro (wat lichter)
39	Biologisch stro
40	Biologisch roggestro oogst augustus 2013
41	Gangbaar tarwestro oogst augustus 2013

## **2.2 Monitoringspakket**

### **2.2.1 *Aspergillus fumigatus***

Alle monsters zijn getest op de volgende aspecten:

- aanwezigheid van *A. fumigatus* in het monstermateriaal. Hierbij is niet gediscrimineerd op resistente en niet-resistente stammen en op aseksuele en seksuele vormen.
- aanwezigheid van resistente *A. fumigatus* in het monstermateriaal. Hierbij is niet gediscrimineerd op seksuele en aseksuele sporen maar wel op resistente versus niet resistente sporen. Door de *toevoeging* van itraconazol kunnen alleen resistente stammen groeien (tabel 2.7).
- aanwezigheid van seksuele sporen van *A. fumigatus* in het monstermateriaal. Door een waterbehandeling van 70°C gedurende 1 uur worden de aseksuele vormen gedood, terwijl eventueel aanwezige seksuele vormen wel kunnen overleven. Deze zullen dan tot kolonies op de plaat kunnen uitgroeien (tabel 2.7).

**Tabel 2.7 Schema van behandelingen ter beoordeling van type testuitslag microbiële bepaling *A. fumigatus*.**

Vóór waterbad		Na waterbad	
Geen itraconazol in agar	Wel itraconazol in agar	Geen itraconazol in agar	Wel itraconazol in agar
<b>Test op</b>			
Aseksuele sporen (conidia)	Seksuele en aseksuele sporen resistent	Seksuele sporen niet resistent	Seksuele sporen resistent
Seksuele sporen (ascosporen)		Seksuele sporen resistent	
Niet resistente sporen			
Resistente sporen			

De monsters zijn genomen door CLM, bij de groencompostering in samenwerking met Radboudumc. De microbiologische analyses zijn uitgevoerd door microbiologen van het Radboudumc.

## 2.2.2 Azoolfungiciden

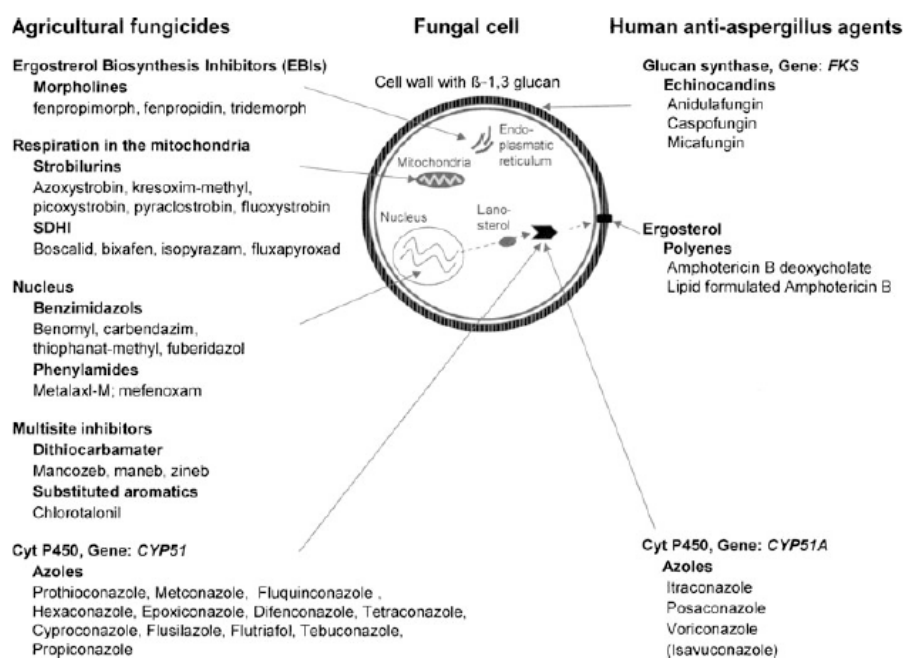
In het restmateriaal van de bloembollen zijn ook twee monsters geanalyseerd op het voorkomen van residuen van bestrijdingsmiddelen via de GC-MS-techniek (pakket van 317 werkzame stoffen, inclusief de azolen). Het betreft pelafval van de monsters 35 (pelafval 10 cm diepte) en 36 (pelafval 20 cm diepte). De chemische analyses zijn uitgevoerd door een gespecialiseerd bedrijf (laboratorium Zeeuws Vlaanderen, onderdeel van Eurofins).

Snelders et al. (2012 en 2009) hebben aangetoond dat er vijf azolen zijn met een grote gelijkenis met medische triazolen (molecuulstructuur, resistentiemechanisme in *A. fumigatus* stam TR<sub>34</sub>/L98H): propiconazool, bromuconazool, epoxiconazool, difenoconazool en tebuconazool. Bromuconazool heeft geen toelating in Nederland (register toegelaten middelen Ctgb, geraadpleegd 26 februari 2013).

Uit het onderzoek van Snelders et al. bleken de fungiciden metconazool en imazalil ook effectief te zijn tegen *A. fumigatus*, maar minder actief tegen isolaten met het TR<sub>34</sub>/L98H resistentie mechanisme. De molecuulformule van beide stoffen is minder vergelijkbaar met dat van de medische azolen dan die van de eerder genoemde vijf azolen.

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 (zie figuur 2.1).

De stoffen prothioconazool en cyproconazool zijn ook meegenomen in het onderzoek van Snelders et al., maar de activiteit tegen de onderzochte *A. fumigatus* stam van deze stoffen bleek relatief laag.



**Figuur 2.1 Aangrijpingspunt fungiciden op schimmelcel (Stensvold et al. 2012).**

Van bovengenoemde stoffen hebben fluquinconazool, hexaconazool, tetraconazool, flusilazool, en flutriafol geen toelating in Nederland (register toegelaten middelen Ctgb, 26 februari 2013) en ze komen ook niet voor in het register van vervallen middelen.

Als beide groepen worden samengevoegd, dan zijn de volgende stoffen nog toegelaten in Nederland: propiconazool, epoxiconazool, difenoconazool, tebuconazool, cyproconazool, prothioconazool en metconazool. Het gebruik varieert van ruim 200 kg propiconazool tot bijna 20.000 kg voor prothioconazool (Tabel 2.8).

**Tabel 2.8 Jaarlijks gebruik van azolen in de land- en tuinbouw in Nederland, 2008.**

Middel	Areaal met gebruik (ha)	Gebruik (kg)	Belangrijkste gewassen
Propiconazool	1.590	241	perkplanten (52%), potplanten (17%), bos/haag (14%), glasbloemen (12%)
Epoxiconazool	129.242	17.411	wintertarwe (67%), suikerbiet (19%), zomergerst (10%)
Difenoconazool	18.097	2.022	suikerbiet (34%), asperge (16%), sluitkool (10%), peer (10%)
Tebuconazool	70.115	14.352	wintertarwe (23%), tulp (23%), graszaad (11%), lelie (10%)
Cyproconazool	43.385	2.400	wintertarwe (55%), suikerbiet (38%)
Prothioconazool	116.835	19.634	wintertarwe (70%), tulp (10%)
Metconazool	13.640	797	wintertarwe (93%)

Bron: CBS 2008 (=meest recente data CBS).

## 2.3 Monitoringschema

In de periode 17 juli-9 oktober 2013 is op een aantal locaties de monsternamen uitgevoerd (tabel 2.9).

**Tabel 2.9. Bemonstering groencompostering, bollenteelt en stro.**

<b>Datum (2013)</b>	<b>Monster</b>
17 juli	18 monsters van verschillende uitgangsmaterialen en stadia in composteringsproces bij een groencomposteerder
19 juli	6 monsters van 2 plantensoorten en een watermonster bij een kuisplantenteler met potplanten
19 juli	4 monsters van pelafval en composthoop broeiafval bij een bloembollenteler (gangbaar)
21 augustus	1 monster van tulpenbollen (droogverkoop) op Schiphol
20 september	1 monster pelafval van biologische bollenteler
20 september	2 monsters tarwestro van gangbare telers
1 oktober	6 monsters van pelafval en composthoop broeiafval bij een bloembollenteler
4 oktober	3 monsters stro (gangbaar en biologisch (roggestro))
9 oktober	26 monsters van verschillende uitgangsmaterialen en stadia in composteringsproces bij een groencomposteerder
<b>Totaal</b>	<b>69 monsters</b>



# 3 Resultaten

## 3.1 Analyseresultaten *A. fumigatus* in groencompostering

In de eerste bemonsteringsronde in juli 2013 zijn zowel de niet-resistente als resistente stammen van *A. fumigatus* in hoge aantallen aangetroffen in het composteringsproces (tabel 3.1.). Het is opvallend dat voor beide de hoogste aantallen voorkomen in de ingangsfase en in de eerste stappen (ril en tafel). In de latere stappen (narijping en eindfase) zijn de aantallen lager en bijna afwezig. In de houtsnippers, de zeefgrond, de grashoop, een 1 dag oude ril, in alle tafels en in compost in de eindfase zijn seksuele sporen gevonden. In een deel van het ingangsmateriaal (zeefgrond en gras) en in de 1 dag oude ril zijn resistente seksuele sporen aangetroffen (tabel 3.1). Dit lijkt te duiden op het voorkomen van seksuele sporen onder milieuocondities. Dit is voor zover bekend nog niet eerder aangetoond in het milieu.

*Bij een herhalingsanalyse van de monsters zeefgrond en gras (3 en 4) met tussentijds ingevroren materiaal (-80 °C) bleek bij het opnieuw inzetten van kweken met droog materiaal i.p.v. een suspensie geen resistente seksuele sporen van *A. fumigatus* aangetroffen te worden, wel andere Aspergillus soorten. Het is de vraag of hier sprake is van een verstoring van de seksuele cyclus van *A. fumigatus* door het invriezen. En mogelijk stimuleert de vriesstap de ontkieming van andere Aspergillus soorten.*

**Tabel 3.1 Voorkomen *A. fumigatus* in groencompostering bij de verschillende behandelingen na 48 uur incubatie (de getallen geven het aantal kolonies weer op de agarplaat; leeg = niet aangetroffen) - 1<sup>e</sup> monsterronde groencompostering 17 juli 2013.**

Nr.	Materiaal	Voor waterbad, geen itraconazol [aanwezigheid <i>A. fumigatus</i> ]	Voor waterbad, wel itraconazol [aanwezigheid resistente <i>A. fumigatus</i> ]	Na waterbad geen itraconazol [aanwezigheid seksuele sporen <i>A. fumigatus</i> ]	Na waterbad, wel itraconazol [aanwezigheid resistente seksuele sporen <i>A. fumigatus</i> ]
<b>1<sup>e</sup> fase: Ingangsmateriaal</b>					
1	Houtsnippers	>500	>200	17	
2	Kienhout	>200	1		
3	Zeefgrond	>500	>200	13	11
4	Gras	>500	>200	20	1
5	Blad				
6	Zeefoverloop	ca. 100	24		
<b>2<sup>e</sup> fase: Ril</b>					
7	Batch 1 dag	>200	>200	ca. 100	10
8	Batch 3 dagen	32			
<b>3<sup>e</sup> fase: Tafel</b>					
9	Batch 10 dagen	100	1	1	



10	Batch 20 dagen	>100	10	7	
11	Batch 30 dagen	>200	80	4	
12	Batch 40 dagen	>500	60	37	
13	Batch 50 dagen	>500	25	14	
<b>4<sup>e</sup> fase: Narijping</b>					
14	Batch narijping	60			
<b>5<sup>e</sup> fase: Eindfase</b>					
15	Schimmeldominante mulch	ca. 150			
16	Groencompost	30	1		
17	Schimmeldominante humuscompost	30 (klein)	30 (klein)		
18	Compost	>200 (klein)	>200 (klein)	15	

In de tweede bemonsteringsronde op 9 oktober is een serie van nieuwe monsters genomen in de verschillende stromen bij de groencomposteerder. Het betreft 26 monsters van ingangsstromen en de verschillende composteringsstadia. Nu zijn er ook monsters op 30 cm diepte (en enkele op 50 cm) genomen om een mogelijk temperatuureffect zichtbaar te maken, evenals een monster compostthee.

Ook in deze ronde in oktober zijn zowel de niet-resistente als resistente stammen van *A. fumigatus* in –soms zeer- hoge aantallen aangetroffen in het composteringproces (tabel 3.2.). Opnieuw komen de hoogste aantallen voorkomen in de ingangsfase en in de eerste stappen (ril en tafel). In de latere stappen (narijping en eindfase) zijn de aantallen lager. Het is duidelijk dat ook op 30 en 50 cm diepte hoge aantallen *A. fumigatus* voorkomen. Dit keer zijn alleen in groencompost 2 kolonies niet resistente seksuele sporen aangetroffen.

**Tabel 3.2 Voorkomen *A. fumigatus* in groencompostering bij de verschillende behandelingen na 48 uur incubatie (de getallen geven het aantal kolonies weer op de agarplaat; leeg = niet aangetroffen) - 2<sup>e</sup> monsterronde 9 oktober 2013.**

Nr.	Materiaal	Voor waterbad, geen itraconazool <i>[aanwezigheid A.fumigatus]</i>	Voor waterbad, wel itraconazool <i>[aanwezigheid resistente A.fumigatus]</i>	Na waterbad geen itraconazool <i>[aanwezigheid seksuele sporen A.fumigatus]</i>	Na waterbad, wel itraconazool <i>[aanwezigheid resistente seksuele sporen A.fumigatus]</i>
<b>1<sup>e</sup> fase: Ingangsmateriaal</b>					
44	Blad oppervlak	ca. 200	20		
45	Blad 30 cm diepte				
46	Hout oppervlak	ca. 300	66		
47	Hout 30 cm diepte	ca. 400	ca. 200		
48	Gras oppervlak	>1000	>500		
49	Gras 30 cm diepte	>1000	>1000		
50	Kienhout oppervlak	ca. 100	20		
51	Kienhout 30 cm diepte	>500	ca. 100		
52	Zeefgrond oppervlak	>1000	>1000		

53	Zeefgrond 30 cm	>1000	>1000		
54	Zeefoverloop oppervlak	>1000	>1000		
55	Zeefoverloop 30 cm	ca. 200	6		
<b>2<sup>e</sup> fase: Ril</b>					
56	Ril 0 dagen oppvlak	>1000	>500		
57	Ril 0 dagen 30 cm	>1000	>500		
<b>3<sup>e</sup> fase: Tafel</b>					
58	Batch 10 dagen	ca. 500	26		
59	Batch 10 dg 30 cm	57			
60	Batch 10 dg 50 cm	83	2		
61	Batch 50 dagen	12	3		
62	Batch 50 dg 30 cm	2			
63	Batch 50 dg 50 cm	6			
<b>4<sup>e</sup> fase: Narijping</b>					
64	Batch oppvlak	62	8		
65	Batch 30 cm				
<b>5<sup>e</sup> fase: Eindfase</b>					
66	Groencompost oppvlak	>500	44		
67	Groencompost 30 cm	27			
68	Groencompost 50 cm	150	26	2	
69	Compostthee vloeibaar	ca. 100	3		

Naast *A. fumigatus* zijn nog enkele andere opvallende schimmels aangetroffen. In het bladmonster op 30 cm diepte is de deuteromyceet *Paecilomyces* aangetroffen. In een aantal andere monsters zijn *A. niger* en zygomyceten gevonden.

Er zijn geen azoolanalyses uitgevoerd in de compost.

### 3.2 Analyseresultaten *A. fumigatus* in restmateriaal bloembollen

In het bolafval is *A. fumigatus* in hoge aantallen aangetroffen (tabel 3.3.), waaronder ook azoolresistente stammen. Het pelafval bevat alleen azoolresistente *A. fumigatus* stammen bevat, in zeer hoge aantallen. Er zijn geen seksuele sporen aangetroffen in het materiaal. Er is verder geen kwantitatieve informatie over de temperatuur, behalve dat er een hogere temperatuur waarneembaar was in de diepere monsterlagen. Geschat wordt dat de temperatuur 30 à 45 °C bedroeg.

**Tabel 3.3 Voorkomen van *A. fumigatus* in restmateriaal van bloembollen bij de verschillende behandelingen na 48 uur incubatie (de getallen geven het aantal kolonies weer op de agarplaat; leeg = niet aangetroffen) - 1e monsterronde 19 juli 2013.**

Nr.	Materiaal	Voor waterbad, geen itraconazool [aanwezigheid <i>A.fumigatus</i> ]	Voor waterbad, wel itraconazool [aanwezigheid resistente <i>A.fumigatus</i> ]	Na waterbad geen itraconazool [aanwezigheid seksuele sporen <i>A.fumigatus</i> ]	Na waterbad, wel itraconazool [aanwezigheid resistente seksuele sporen <i>A.fumigatus</i> ]
19	Tulp afval oppvlak	>500	ca. 200		
20	Tulp-afval 5 cm	ca. 300	ca. 150		
21	Tulp-afval 10 cm	ca. 150	50		
22	Pelafval*	>500	>500		
29	Tulpenbollen	1			

\* Monster 22 is in 4 verschillende stappen verdund: 50, 100, 200 en 400x. In de verdunningen 50-200x waren zowel met als zonder itraconazool de kolonies niet te tellen en zelfs bij 400x waren er in beide gevallen zo'n 250 kolonies.

Het beeld van de resultaten bij de monsters van de gangbare bollenteelt is vergelijkbaar met de ronde in juli (tabel 3.4), hoge aantal azoolresistente *A. fumigatus* in pelafval, zowel bij oppervlaktemonsters als bij dieper genomen monsters. In het biologische materiaal (geen of zeer lage azooldruk) is geen resistente *A.fumigatus* aangetroffen. Ook de dichtheid van niet-resistente *A. fumigatus*, ligt in het biologisch pelafval lager dan in het gangbare materiaal. In tegenstelling tot het gangbare materiaal was het biologische pelafval droog.

**Tabel 3.4 Voorkomen *A. fumigatus* in restmateriaal van bloembollen in de verschillende behandelingen na 48 uur incubatie (de getallen geven het aantal kolonies weer op de agarplaat; leeg = niet aangetroffen) - 2e monsterronde oktober 2013.**

Nr.	Materiaal	Voor waterbad, geen itraconazol [aanwezigheid <i>A.fumigatus</i> ]	Voor waterbad, wel itraconazool [aanwezigheid resistente <i>A.fumigatus</i> ]	Na waterbad geen itraconazool [aanwezigheid seksuele sporen <i>A.fumigatus</i> ]	Na waterbad, wel itraconazool [aanwezigheid resistente seksuele sporen <i>A.fumigatus</i> ]
30	Pelafval biologische bollen (droog materiaal)	7			
33	Vers pelafval	8	3		
34	Pelafval oppvlak	>500	>500		
35	Pelafval 10 cm	>500	>500		
36	Pelafval 20 cm	>500	>500		
37	Compost oppvlak	ca. 300	ca. 90		
38	Compost 20 cm	ca. 250	ca. 80		

Er zijn in beide bemonsteringsrondes in het bollenafval geen (resistente) seksuele sporen aangetroffen (tabel 3.3. en 3.4).

De bestrijdingsmiddelenmetingen van het pelafval laten zien dat in de monsters twee azolen zijn aangetroffen, en daarnaast nog enkele andere middelen (tabel 3.5).

In monster 35 (pelafval 10 cm diepte) is prothioconazool (productnaam Rudis) gevonden in hoge concentratie (9,2 mg/kg versgewicht). Ook de metaboliet prothioconazool-destio is aangetroffen in dit monster (0,49 mg/kg versgewicht). Rudis is door de bollenteler toegepast in het dompelbad voor de bolontsmetting.

In monster 36 (pelafval 20 cm diepte) is de azool tebuconazool (productnaam Folicur) in lage concentratie aangetroffen (0,01 mg/kg versgewicht)(tabel 3.6). Dit middel is toegepast als gewasbespuiting. Monster 36 bevat ook hoge concentraties boscalid en pyraclostrobine, en een lage concentratie kresoxim-methyl.

De dosering van Rudis is maximaal 1,25 liter per ha (gebaseerd op een gemiddelde hoeveelheid bollen per hectare). Met een gehalte aan werkzame stof van 480 g per liter Rudis komt de hoeveelheid prothioconazool op 600 g/ha. Volgens Smakman (2012) levert een hectare bollen een hoeveelheid droog pelafval van 3000 kg. Dit is een waarde die gerelateerd is aan bollen die zijn gerooid in de zomer en dan vrij snel worden gepeld. Maximaal zou een concentratie van 200 mg/kg kunnen optreden, wanneer alle werkzame stof via het ontsmettingsbad in het pelafval terecht zou komen. Dat zal niet het geval zijn. Het ontstaan van een concentratie van 9,2 mg/kg in het pelafval is wel een realistische mogelijkheid volgens deze indicatie.

**Tabel 3.5 Analyseresultaten van metingen van bestrijdingsmiddelen in monster nr. 35 pelafval 10 cm diepte.**

<b>Werkzame stof</b>	<b>Concentratie (mg/kg) (versgewicht)</b>
Prothioconazool (Rudis)	9,2
Prothioconazool-destio (metaboliet)	0,49

**Tabel 3.6 Analyseresultaten van metingen van bestrijdingsmiddelen in monster nr. 36 Pelafval 20 cm diepte.**

<b>Werkzame stof</b>	<b>Concentratie (mg/kg) (versgewicht) *</b>
Boscalid (Collis)	13
Kresoxim-methyl (Collis)	0,22
Pyraclostrobine (Securo)	53
Tebuconazool (Folicur)	0,01 (=rapportagegrens)

\* Het droge stofgehalte van de monsters bij analyse wordt geschat tussen de 30% en 50%.

### 3.3 Analyseresultaten *A. fumigatus* in materiaal kuipplantenteelt

In de potgrondmonsters van de kuipplanten die geteeld zijn in een kasomgeving zijn alleen lage aantallen *A. fumigatus* aangetroffen, waarbij in twee monsters een beperkt aantal resistente *A. fumigatus* (tabel 3.7).

**Tabel 3.7 Voorkomen *A. fumigatus* in de verschillende kuipplantmonsters in de verschillende behandelingen na 48 uur incubatie (de getallen geven het aantal kolonies weer op de agarplaat; leeg = niet aangetroffen).**

Nr.	Materiaal	Voor waterbad, geen itraconazol [aanwezigheid <i>A. fumigatus</i> ]	Voor waterbad, wel itraconazol [aanwezigheid resistente <i>A. fumigatus</i> ]	Na waterbad geen itraconazol [aanwezigheid seksuele sporen <i>A. fumigatus</i> ]	Na waterbad, wel itraconazol [aanwezigheid resistente seksuele sporen <i>A. fumigatus</i> ]
23	Potgrond Lantana (wortelkluit)	3			
24	Potgrond Lantana geel/wit (wortelkluit)	6			
25	Potgrond Lantana geel (wortelkluit)	8			
26	Potgrond Lantana geel/wit (oppervlak grond)	12	4		
27	Potgrond Solanum (geen azoolgebruik)	12	1		
28	Watermonster				

Er zijn in de potgrond van de kuipplanten geen (resistente) seksuele sporen aangetroffen (tabel 3.7.).

Er zijn geen azoolanalyses uitgevoerd in de kuipplantmonsters.

### 3.4 Analyseresultaten *A. fumigatus* in stro-monsters

In twee van de vijf stromonsters zijn alleen zeer lage aantallen *A. fumigatus* aangetroffen, waarbij in een biologisch stro-monster enkele resistente *A. fumigatus* (tabel 3.8). Uit de literatuur komt een beeld naar voren dat stro een van de natuurlijke habitats is voor aspergillus. In deze analyse worden niet of nauwelijks *A. fumigatus* sporen gevonden op de stro-monsters. Het betreft hier droog stro dat al enkele maanden in opslag heeft gelegen.

Opvallend is dat in een van de biologisch stro-monsters zowel niet-resistente als resistente *A. fumigatus* is gevonden. Dat kan mogelijk verklaard worden doordat er sprake is van een natuurlijke achtergrondwaarde in het stro. En (wellicht) doordat er geen fungiciden zijn gebruikt.

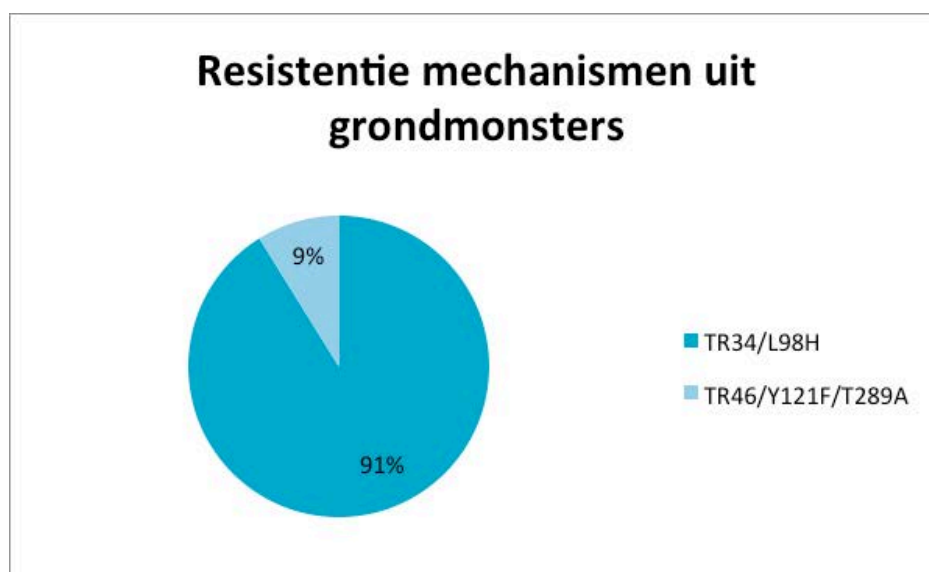
**Tabel 3.8 Voorkomen *A.fumigatus* in de verschillende stro-monsters in de verschillende behandelingen na 48 uur incubatie (de getallen geven het aantal kolonies weer op de agarplaat; leeg = niet aangetroffen).**

Nr.	Materiaal	Voor waterbad, geen itraconazol [aanwezigheid <i>A. fumigatus</i> ]	Voor waterbad, wel itraconazol [aanwezigheid resistente <i>A. fumigatus</i> ]	Na waterbad geen itraconazol [aanwezigheid seksuele sporen <i>A. fumigatus</i> ]	Na waterbad, wel itraconazol [aanwezigheid resistente seksuele sporen <i>A. fumigatus</i> ]
31	Stro bedrijf 1				
32	Stro bedrijf 2				
39	Biologisch tarwestro				
40	Biologisch roggestro	3	1		
41	Tarwestro	1			

Er zijn geen azoolanalyses uitgevoerd in de stro-monsters.

### 3.5 Type mutaties

Op een steekproef van 50 azoolresistente *A. fumigatus* die gekweekt werden in het milieu is nader onderzoek verricht om de onderliggende resistentiemechanismen in kaart te brengen en de gevoeligheid voor de medische azolen. Het resistentiemechanisme werd bepaald door een gerichte PCR-test, waarmee resistentie mutaties die geassocieerd zijn met het milieu aangetoond kunnen worden. Daarnaast is de aanwezigheid van deze mutaties en de afwezigheid van andere resistentiemechanismen in het Cyp51A-gen bevestigd door sequentieanalyse van het betreffende gen. In de onderzochte azoolresistente isolaten werden uitsluitend 2 bekende resistentiemechanismen aangetroffen: TR<sub>34</sub>/L98H en TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A. De grote meerderheid van mutaties betrof TR<sub>34</sub>/L98H (Figuur 3.1).



**Figuur 3.1** Gevonden mutaties en verdeling in een steekproef van de *A. fumigatus* isolaten gekweekt uit het milieu.

Alle stammen vertonen resistentieprofielen die passen bij de gevonden resistentiemechanismen en zijn pan-azool resistent (tabel 3.9).

**Tabel 3.9 In vitro gevoeligheid van 50 *A. fumigatus* isolaten gekweekt uit het milieu voor de medische azolen itraconazol (ITC), voriconazol (VRC) en posaconazol (POS).**

CYP51A mutatie	Aantal isolaten	MIC (mg/L)		
		ITC	VRC	POS
TR <sub>34</sub> /L98H	41	>16	4->16	0,25-2
TR <sub>46</sub> /Y121F/T289A	4	>16	≥16	1-2

# 4 Discussie

---

In het onderzoek naar oorzaken van de toename van de mate waarin resistente stammen van *A. fumigatus* worden aangetroffen in patiënten, is het belangrijk onderscheid te maken in situaties waarin:

- de condities zodanig zijn dat er nieuwe mutaties optreden, waardoor *A. fumigatus* resistent wordt tegen azoolhoudende medicijnen;
- de reeds aanwezige resistente *A. fumigatus* stammen een concurrentievoordeel hebben t.o.v. niet resistente stammen, waardoor selectie plaats vindt.

Deze verkenning is daarom gebaseerd op twee inzichten die mogelijk belangrijk zijn voor resistentieselectie bij *A. fumigatus* in het milieu:

- 1) een mogelijke rol voor de seksuele reproductie van *A. fumigatus* en
- 2) blootstelling aan hoge concentraties van azoolfungiciden.

De selectie van de bemonsterde materialen is hierop gebaseerd alsmede de wijze waarop de monsters in het laboratorium bewerkt zijn. Identificatie van condities waarin resistentieselectie plaatsvindt of de groei van azoolresistente stammen dominant is (zgn. 'hot spots') is belangrijk, omdat het probleem van resistentieselectie dan toe te schrijven is aan bepaalde toepassingen van azoolfungiciden. Inzicht in deze toepassingen kan onderzoek initiëren naar alternatieve werkwijzen of gebruik van alternatieve middelen. Dit zou kunnen leiden tot vermindering van resistentieselectie in *A. fumigatus*.

De eerste stap in onderzoek naar 'hot spots' is om vast te stellen of *A. fumigatus* überhaupt in staat is te groeien in de materialen. *A. fumigatus* heeft bepaalde condities nodig om te groeien. Deze betreffen o.a.:

- RV/vrij water;
- voldoende hoge temperatuur;
- voldoende licht(spectrum);
- voldoende zuurstofspanning;
- voldoende nutriënten, N,C, sporenelementen en andere mogelijk stimulerende stoffen;
- zuurgraad;
- oppervlaktekenmerken van het substraat;
- soortensamenstelling en dichtheid andere microbiologie.

Ook kennis van de aanwezigheid van predatoren, antagonisten en eventueel remmende stoffen is relevant.

In de meeste materialen in de landbouw zijn de condities niet stabiel over de tijd. De door ons uitgevoerde metingen zijn daarom slechts een moment opname. Voor een goed inzicht zouden per meting meerdere plaatsen bemonsterd moeten worden, op verschillende diepten en op meerdere tijdstippen.

Naast deze basale omstandigheden zijn er omstandigheden die resistentieselectie mogelijk maken:

- het voorkomen van complementaire mating types (i.r.t. seksuele cyclus);
- de aanwezigheid, type, concentratie en blootstellingsduur (continue versus intermitterend) aan azolen.



De verhouding tussen resistente- en gevoelige *A. fumigatus* kolonies, zoals onderzocht, kan een goede indruk geven omtrent de azooldruk in een bepaald milieu. We hebben in dit onderzoek niet verder gekeken naar bijvoorbeeld de verdeling van matingtypen en hebben slechts op 1 locatie concentraties van azolen gemeten.

We hebben oriënterend onderzoek verricht naar het voorkomen van ascosporen in het milieu. Door de onderzochte monsters gedurende 1 uur bij 70°C te verhitten, worden alle asexuele sporen gedood en kan groei van kolonies alleen verklaard worden door ontkiemen van de ascosporen. Dit is een indirecte methode om seksuele sporen aan te tonen, en nader onderzoek is noodzakelijk om de aanwezigheid van deze sporen te bewijzen.

#### Groencompostering

Hoewel ons onderzoek beperkt was, zijn er belangrijke aanknopingspunten gevonden. We vonden azoolresistente *A. fumigatus* veelvuldig in de ingangstromen van compost. Dit past bij het verondersteld wijdverbreid voorkomen van resistentie in het milieu. Opvallend in de resultaten is dat in bepaalde monsters, zoals bladeren, vrijwel geen resistentie werd aangetroffen. Daarnaast vonden we dat het composteren zelf leidde tot afname van *A. fumigatus*, zowel gevoelig als azoolresistent. Aangezien de literatuur compost aanduidt als de belangrijkste niche voor *A. fumigatus* was deze bevinding opvallend. Tijdens het composteren worden temperaturen van 60 tot 70°C bereikt. Bij deze temperatuur kunnen de asexuele sporen niet overleven (zie figuur 4.1). Als er seksuele sporen aanwezig zijn, zullen deze waarschijnlijk na ontkieming ook afsterven.

	TIJD						
TEMP	controle	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
controle	++++						
56 °C	24h	-	-	-	-	-	-
	48h	++	++	++	+	+	+
	72h	++++	+++	+++	+++	+++	+++
60 °C	24h	-	-	-	-	-	-
	48h	+	+	+	+	-	-
	72h	++	+	+	+	+	-
65°C	24h	-	-	-	-	-	-
	48h	+	-	-	-	-	-
	72h	++	-	-	-	-	-
70 °C	24h	-	-	-	-	-	-
	48h	-	-	-	-	-	-
	72h	-	-	-	-	-	-

**Figuur 4.1** Effect van temperatuur op de afdoding van asexuele *A. fumigatus* sporen.

#### Bollen-pelafval

Een andere opvallende bevinding was ook het hoge aantal azoolresistente *A. fumigatus* in pelafval in van bloembollen. Er bleken in het laboratoriumonderzoek hoge aantallen te groeien in afwezigheid van azolen maar ook in aanwezigheid van azo-

len. Dit zou kunnen wijzen op het feit dat hier uitsluitend azoolresistente *A. fumigatus* groeit, wat het gevolg zou zijn van een milieu waarin alleen resistente stammen zich kunnen handhaven. Beperkte metingen van azoolconcentraties lieten inderdaad hoge concentraties van de azool prothioconazool zien. De bollen worden tijdens de bolontsmetting voorafgaand aan de teelt blootgesteld aan hoge concentraties van fungiciden en zou daarmee een hoog risico hebben op resistentie-selectie, zoals ook aangegeven door Gisi et al. (2013). Herhaalde metingen gaven opnieuw een hoog aantal resistente stammen. Als controle werd pelafval van een biologische teler meegenomen, waar vrijwel geen *A. fumigatus* en geen resistentie werd aangetroffen. Hoewel het voor de hand ligt dit te correleren aan de afwezigheid van azooldruk, waren de omstandigheden (namelijk duidelijk droger materiaal) ongunstiger voor groei van de *A. fumigatus* schimmel.

#### Potplantenteelt

In het materiaal uit de potplantenteelt werden in alle substraten sporen van *A. fumigatus* aangetroffen. Slechts in twee monsters werden ook lage aantal resistente vormen gevonden. In één van de gevallen was dat een kuipplant die zelf niet met een azoolhoudend middel was behandeld. Bij het andere monster ging het om de bovenkant van de pot. Er is een keer een azoolhoudend middel als groeiregulator gebruikt. Dit wordt met een spuitboom toegepast. Vloeistof kan van het gewas op de potgrond komen. Bij de andere monsters is de onderkant van de wortelkluif bemonsterd. Daar zijn geen resistente sporen in gevonden. Het aantal monsters en de herhalingen zijn echter te gering om er harde conclusies aan te verbinden. Meer herhalingen zijn daarom gewenst.

#### Stro

Opvallend was verder dat in de vijf onderzochte stromonsters, waarvan twee biologisch er niet tot nauwelijks *A. fumigatus* werd aangetroffen. Dit kan te maken hebben met het feit dat het stro in alle gevallen erg droog was. Ook zou het tegengaan van fungicideresistentie van plantpathogene schimmels in de granen zelf wellicht kunnen meespelen. Ook in de graanteelt wordt in toenemende mate resistentie tegen azolen waargenomen, waardoor er steeds uitgebreidere cocktails van verschillende actieve stoffen tegen schimmels worden ingezet.

In één geval (biologisch roggestro) werden er resistente stammen aangetroffen. Onduidelijk is waarom. Mogelijk is hier sprake van verwaaiing en kolonisaties door alom aanwezige sporen van *A. fumigatus*. Door het niet tot nauwelijks aantreffen van *A. fumigatus* in de monsters zijn er geen monsters genomen van de residuen van azolen en andere gewasbeschermingsmiddelen op het stro.

Ons onderzoek toont aan dat we de huidige biotoop van *A. fumigatus* niet goed in beeld hebben. In de moderne maatschappij zijn er allerlei veranderingen die invloed kunnen hebben op het voorkomen van deze schimmel. Daarnaast zijn er talloze handelingen en procedures binnen de landbouw, mogelijk de veeteelt en mogelijk bij de toepassing van biociden die omstandigheden creëren die enerzijds de selectie van resistentiemutaties faciliteren of anderzijds de groei van hoge aantallen resistente sporen. Naar beide mogelijkheden dient nader onderzoek plaats te vinden.

Hoewel azoolresistente *A. fumigatus* wijdverbreid is in ons milieu, toont ons onderzoek al wel aan dat er 'hot spots' zijn waar er intensief contact is tussen de fungicide en de schimmel. Dit betekent dat het identificeren en aanpassen van deze 'hot spots' de mogelijkheid biedt specifieke maatregelen te nemen die resistentievorming verminderd zonder dat het gebruik van deze middelen opgegeven moet worden. Ook hiertoe zou nader onderzoek verricht moeten worden.



# 5 Conclusies en aanbevelingen

---

## 5.1 Conclusies

Deze verkenning heeft de volgende inzichten opgeleverd:

### **1. Er zijn indicaties over het aantreffen van resistente stammen van *A. fumigatus* op locaties in de land- en tuinbouw**

De verkenning is indicatief en de resultaten zijn bruikbaar om richting te geven aan verder onderzoek, maar zijn niet bruikbaar om wetenschappelijke conclusies over ontwikkeling van resistenties te trekken.

### **2. Er zijn resistente stammen en seksuele sporen van *A. fumigatus* aangetroffen in de groencompostering**

In de groencompostering, met naar verwachting een relatief lage azooldruk, zijn veel resistente *A. fumigatus* stammen aangetroffen. Dit lijkt te wijzen op een wijd-verbrede aanwezigheid en verspreiding van resistente stammen die dan vervolgens worden aangetoond in veel stromen waarin *A. fumigatus* van nature voorkomt. In het ingangsmateriaal zijn de aantallen het hoogst. Gedurende het composteringsproces nemen de aantallen *A. fumigatus* sterk af. In de eindfase worden hoofdzakelijk lage aantallen aangetroffen.

De 1<sup>e</sup> monsternamen in de groencompostering leverde een indicatie van het voorkomen van seksuele sporen van *A. fumigatus*. Deze sporen zijn nooit eerder in de natuurlijke omgeving aangetroffen. In een herhaling met ingevroren materiaal werden de seksuele sporen niet meer aangetroffen. In de 2<sup>e</sup> monsternamen is in 1 monster een indicatie van seksuele sporen verkregen. Het is niet duidelijk waarom de seksuele sporen dit keer veel minder zijn aangetroffen. Een mogelijke verklaring kan zijn dat op een ander moment in het jaar is bemonsterd (juli versus oktober).

### **3. Er zijn grote aantallen sporen van resistente stammen van *A. fumigatus* gevonden in pelafval van bollenteelt**

In het pelafval (vellen van geogste tulpenbollen) van een gangbare bollenteler die de bollen voorafgaand aan de teelt dompelt in azolen, zijn hoofdzakelijk azoolresistente *A. fumigatus* stammen in grote getale aangetroffen. De azolen prothioconazole en tebuconazole waren in het pelafval aanwezig. Deze omgeving kan als een "hot spot"<sup>3</sup> worden aangemerkt. Er zijn geen seksuele sporen aangetroffen. Wel is

---

<sup>3</sup> Combinatie van agrarische locaties en stromen, procescondities (o.a. temp, zuurstof, pH, substraat en licht) en azooldruk (concentratie, constante of intermitterende blootstelling), waar omstandigheden zodanig zijn dat er mogelijk mutaties en resistentie optreden en waar het aandeel resistente stammen substantieel groter is dan niet-resistente stammen.

duidelijk dat hier sprake is van selectie op resistente stammen door de sterke en naar verwachting vrij constante azooldruk.

#### **4. *A. fumigatus* is aangetroffen in de potplantenteelt, maar met weinig resistente stammen**

In het materiaal uit de potplantenteelt zijn in alle substraten beperkt sporen van *A. fumigatus* aangetroffen. Slechts in 2 monsters werden ook resistente vormen gevonden, in lage aantallen. Eén daarvan kwam van een kuipplant die zelf niet met een azoolhoudend middel was behandeld. Bij het andere monster ging het om de bovenkant van de pot. Er is daar een keer een azoolhoudend middel als groeiregulator gebruikt.

#### **5. In stro is nauwelijks *A. fumigatus* aangetroffen**

In de 5 onderzochte stromonsters, waarvan 2 biologisch, werd niet tot nauwelijks *A. fumigatus* sporen aangetroffen.

#### **6. Er zijn geen nieuwe mutaties aangetroffen**

Analyse van het fenotype en genotype van een groot aantal van deze azoolresistente stammen toonde de aanwezigheid van de bekende 'omgevings'-mutaties aan: TR<sub>34</sub>/L98H en TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A. Er werden geen nieuwe mutaties aangetroffen.

## **5.2 Aanbevelingen**

In onderstaande aanbevelingen sluiten we 'deels aan bij de aanbevelingen die zijn gedaan door Schoep en Sterenberg 2013. Daarbij doen we meer specifieke aanbevelingen voor onderzoek naar 'hot spots.

### **1. Uitvoering onderzoek naar mutaties van *A. fumigatus***

We bevelen aan vervolgonderzoek te doen naar de relatie tussen azoolfungiciden (en verwante stoffen zoals imazalil) en de nieuwere mutaties TR<sub>53</sub> en TR<sub>46</sub>/Y121F/T289A. Dit kan inzichtelijk maken of triazolen gebruikt in biociden en gewasbeschermingsmiddelen een aandeel hebben in de ontwikkeling van deze nieuwe mutaties, en/of het in stand houden van deze mutaties door constante selectiedruk.

Ook bevelen we vervolgonderzoek aan naar het effect van azool-selectiedruk op de dynamiek van resistente stammen (TR<sub>34</sub>/L98H-mutatie) in een wildtype schimmel populatie. Dit is nodig om eventuele effecten van het reduceren van selectiedruk op de prevalentie van resistentie in kaart te brengen.

## 2. Verder onderzoek naar 'hot spots'

We bevelen aan verder onderzoek te doen naar 'hot spots' met name daar waar azooldruk en gunstige omstandigheden voor *A. fumigatus* samenvallen. Het ligt voor de hand daarbij in te zoomen op de 'hot spots' uit deze verkenning en dit uit te breiden met nieuwe mogelijke 'hot spots'. Daarbij is het zinvol om onderscheid te maken tussen omstandigheden waar azoolresistente mutaties kunnen ontstaan (dus waar seksuele reproductie van *A. fumigatus* plaats zou kunnen vinden) en omstandigheden met een hoge selectiedruk.

Het lijkt aannemelijk dat verlaging van de hoeveelheid azolen in het milieu ook afname van selectiedruk zal betekenen. Het zoeken naar omstandigheden met een hoge selectiedruk heeft echter alleen zin, wanneer eerder genoemd onderzoek uitwijst dat reduceren van selectiedruk daadwerkelijk de prevalentie van resistente schimmels terug kan dringen.

De zoektocht naar beide type 'hot spots' kan op twee manieren plaatsvinden:

- door op basis van literatuur en expert judgement theoretische hotspots te inventariseren en deze gericht te onderzoeken.
- door een monitoringsprogramma op te zetten, waarin concentraties triazolen en het voorkomen van resistente schimmels worden gemeten.

Het advies is om in ieder geval de volgende sectoren in de inventarisatie en het vervolgonderzoek mee te nemen:

### Landbouw

- Extra herhalingen van de eerder genomen monsters (potplanten, de groencompostering, pel- en broeiafval uit de bollenteelt en stro).
- De veehouderijsector: potentiële hotspots in de dierlijke sector zijn potstallen, (vochtig geworden) hooi, vrijloopstallen (compost op de bode). In beginsel zijn alle boxstrooisels of huisvestingsstrooisels in de dierhouderij waarin stromen uit teeltcondities waarin azolen zijn gebruikt belangrijk om te onderzoeken. Hieronder vallen bijvoorbeeld de varkenssector, paardenmanages en pluimveesector.  
In kuikenstallen is het bijvoorbeeld lekker warm en het strooisel dat daar ligt zou een goede groeibodem kunnen zijn voor *Aspergillus*. Pluimvee kan bovendien zelf ook last hebben van *Aspergillus*infecties en er is gerede kans dat middelen op basis van triazolen waar ze mee mogelijk behandeld worden, o.a. via mest in het strooisel belanden.  
Bij onderzoek naar deze plekken zou afstemming gezocht kunnen worden met onderzoek in de veehouderij naar risico's van de ontwikkeling van ziekteverwekkers in bijv. biobedding in stallen en melkkwaliteit.
- De champignon- of paddestoelenteelt: hierin wordt mest (van bijv. paarden, kippen) met stro gebruikt als een belangrijke ingrediënt voor de compost als groeimedium ('champost').
- Ingekuilde mais: dit zou, mede doordat in maïs steeds vaker het middel Re-tengo Plus (werkzame stof epoxiconazool) wordt gebruikt als gewasbehandeling een potentiële hot spot kunnen zijn. Mais kent ook een zaaizaadbehandeling met prothioconazool of triticonazool. De laatste is een triazool die niet in Nederland gebruikt mag worden, terwijl wel zaad geïmporteerd mag worden dat met het middel behandeld. De resistentie van *Aspergillus* tegen dit middel is niet onderzocht.
- Fruit(afval): sommige fruitsoorten kent een na-oogstbehandeling met imazalil (ook tegen deze stof bestaat een bepaalde mate van resistentie).

- Dierentuinen: indien daar stro uit de gangbare akkerbouw wordt gebruikt met mogelijk azoolresidu zal er door de veelal warme(re) en vochtige condities sprake kunnen zijn van een hotspot.

*Buiten de landbouw*

- Houtconservering.
- Afvalbakken (klike's) met GFT-afval.

Bij het identificeren van hotspots en, in een later stadium, bij het zoeken naar oplossingen om resistentieontwikkeling en –selectie terug te dringen, bevelen we aan om kennis uit te wisselen met het Fungicide Resistance Action Committee (FRAC), de technische groep van Crop Life International (de internationale federatie die de plant science industrie vertegenwoordigt). Het FRAC heeft veel ervaring met het tegengaan van fungicideresistentie in de landbouw, waarbij azolen een belangrijk speerpunt zijn.

### **3. Internationale afstemming**

We bevelen aan internationaal af te stemmen over resultaten en verder onderzoek. Uit surveillance-onderzoek elders in de wereld is gebleken dat resistente stammen van *A.fumigatus* steeds vaker ook in andere Europese landen worden gevonden, maar recent ook in Azië en het Midden-Oosten. De gevonden mutaties zijn aan elkaar verwant. Dit zou kunnen betekenen dat ze niet parallel op verschillende plaatsen zijn ontstaan, maar dat de mutatie zich ergens ontwikkeld heeft en zich vervolgens via de lucht heeft verspreid.

Dit vraagt om een internationaal onderzoek. Ook wanneer onderzoek in Nederland uitwijst dat er maatregelen moeten worden genomen om selectiedruk door azolen te verminderen, dan zullen deze internationaal gedragen en afgestemd moeten worden.

Het kabinet heeft (in de brief van staatssecretaris Mansholt van 18 februari 2014) geconstateerd dat binnen de EU, zoals uit informele gesprekken blijkt met andere lidstaten en de Commissie, op dit moment nog geen gevoel van urgentie bestaat voor het thema triazolenresistentie.

Bij een aantal universiteiten in het buitenland bestaat wel aandacht voor de problematiek. We bevelen aan met hen (meer) uitwisseling en afstemming te zoeken.

## Bronnen

---

Advies van de directeur bureau Risicobeoordeling en Onderzoeksprogrammering aan de ministers van LNV, VROM en VWS - Resistentie van *Aspergillus fumigatus* tegen azoolfungiciden 2010. NVWA-Bureau Risicobeoordeling en Onderzoeksprogrammering, Den Haag.

Bennet, J.W. 2010. In *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*, editors M. Machida and K. Gomi Japan.

Brent, K, and DW Hollomon. 2007. Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It Be Managed?. FRAC, Monograph No. 1 (second, revised edition).

Camps, S. 2013. Molecular mechanisms of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. PhD-thesis Radboud University Nijmegen.

Dagenais, T.R.T. and N.P. Keller 2009. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis Clinical Microbiology Reviews vol 22, No. 3 p.447-465.

Denning, D.W. 2013. Voriconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*-should we be concerned? Clinical Infectious Diseases.

Dyer, P.S. and C. M. O'Gorman 2011. A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. Current Opinion in Microbiology 2011, 14: 649-654.

Dyer, P.S. and M. Paoletti 2005. Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? Medical Mycology Supplement I 2005, 43, s7-s14.

European Centre for Disease Prevention and Control 2013. Risk assessment on the impact of environmental usage of triazoles on the development and spread of resistance to medical triazoles in *Aspergillus* species. ECDC Stockholm.

Fisher, M.C. and D.A. Henk 2012. Sex, drugs and recombinations: the wild life of *Aspergillus*. Molecular Ecology 21, 1305-1306.

Gibbons, J.G. and A. Rokas 2013. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. Trends in microbiology, January 2013, Vol 21, No 1.

Gisi, U. 2013. Assessment of selection and resistance risk for DMI fungicides in *Aspergillus fumigatus* in agriculture and medicine: A critical review.

Hall, L.A. and D.W. Denning 1994. Oxygen requirements of *Aspergillus* species. J. Med Microbiol vol 41 311-315.

Hof, H. 2001. Critical Annotations to the Use of Azole Antifungals for Plant Protection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2001, 45(11) 2987-2990.

Klaassen, C.H.W. et al. 2012. Evidence for Genetic Differentiation and Variable Recombination Rates among Dutch Populations of the Opportunistic Human Pathogen *Aspergillus fumigatus*. Mol Ecol.



- Latge JP. 1999. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev.* 12:310-50.
- Lass-Flörl C. 2011. Triazole antifungal agents in invasive fungal infections: a comparative review. *Drugs* 71:2405-19.
- Linden, J.W. van der, E. Snelders, G.A. Kampinga, B.J. Rijnders, E. Mattsson, Y.T. Debets-Ossenkopp, E.J. Kuijper. F.H. van Tiel, W.J. Melchers. P.E. Verweij 2011. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, the Netherlands, 2007–2009. *Emerg Infect Dis* 2011;17:1846-54.
- Linden, Van der, J.W.M., et al. 2013. Aspergillosis due to Voriconazole Highly-resistant *Aspergillus fumigatus* and Recovery of Genetically Related Resistant Isolates from domestic Homes. *Clinical Infectious Diseases* 57 (4), 513-520.
- Menau, I. and D Sanglard 2005. Azole and fungicide resistance in clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* isolates. *Medical Mycology Supplement I* 2005, 43, s307-s311.
- Mortensen, K.L., et al. 2010. Environmental Study of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* and Other Aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54 (11) p 4545-4549.
- O’Gorman, C.M., H.T. Fuller and P.S. Dyer 2009. Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, vol 457, 471-475.
- Roelofs, P.F.M.M. en H. Gude 2013. Kwantitatieve informatie reststromen bloembollen. PPO Bloembollen, Boomkwekerij & Fruit, Lisse.
- Ruger-Herreros, C., et al. 2011. Regulation of Conidiation by Light in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, Vol 188, 809-822.
- Smakman, G.J.J. 2012. De grondstoffenbank als nieuw concept voor decentrale bioraffinage. ACCRES-Wageningen UR Lelystad.
- Schoep, P.S. en I. Sterenborg 2013. Resistentie-ontwikkeling van *Aspergillus fumigates* tegen triazolen door gebruik van biociden en gewasbeschermingsmiddelen. Royal HaskoningDHV Nijmegen.
- Snelders, E. 2012. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: collateral damage of fungicide use. PhD-thesis Radboud University Nijmegen.
- Snelders, E. R.A.G. Huis in ’t Veld, A.J.M.M. Rijs, G.H.J. Kema, W.J.G. Melchers & P.E. Verweij. 2009. Possible Environmental Origin of Resistance of *Aspergillus fumigatus* to Medical Triazoles. *Applied and Environmental Microbiology*, June 2009. p. 4053–4057.
- Snelders, E., S.M.T. Camps, A. Karawajczyk & G. Schaftenaar, G.H.J. Kema, H.A. van der Lee, C.H. Klaassen, W.J.G. Melchers & P.E. Verweij, 2012. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS ONE* 7(3).
- Stensvold, C.R., L. Nistrup Jørgensen & M.C. Arendrup 2012. Azole-Resistant Invasive Aspergillosis: Relationship. *Curr Fungal Infect Rep* (2012) 6:178–191.
- Sugui, J.A., et al. 2011. Identification and Characterization of an *Aspergillus fumigatus* "Supermater" Pair. *mBio* Volume 2 Issue 6 November/December 2011.

Tweede Kamer der Staten-Generaal, Vergaderjaar 2013–2014. Brief (Nr. 229) van de Staatssecretaris van Infrastructuur en Milieu m.b.t. Gewasbeschermingsbeleid, Den Haag, 18 februari 2014.

Van der Weijden, W. en A.J. van der Wal 2012. Resistente schimmels zijn tijdbom. Nieuwe Oogst, maart 2012.

Vermeulen, E., J. Maertens, H. Schoemans, K. Lagrou 2012. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium. Eurosurveillance, Volume 17, Issue 48, 29 November 2012.

Verweij, P.E., E. Snelders, G.H.J. Kema, E. Mellado & W.J.G. Melchers 2008. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a side-effect of environmental fungicide use? Lancet Infect Dis 2009; 9: 789–95.

White, T.C. , et al. 1998. Clinical, Cellular, and Molecular Factors that Contribute to Antifungal Drug Resistance. Clinical Microbiology Reviews vol 11, No. 2 p.382-402.



# Bijlage 1 Aanvullende info over bemonsterde stromen en locaties

## 1 Aanvullende informatie over (groen)compostering

Het composteringsbedrijf composteert via een batchproces. Ruwweg iedere 10 dagen wordt er een nieuwe batch opgezet, bestaande uit 5 a 6 rillen (lagen op rijen). Elke 2 dagen, dus zo'n 5 keer wordt de ril omgezet. De ril wordt regelmatig belucht via een beluchtingssysteem.



**Figuur 1** Rillen van te composteren materiaal.

De temperatuur in de rillen is zo'n 65-70 °C. Na 10 dagen gaan deze rillen op de zogenaamde tafelhoop en wordt door een simpele afscheiding met bordjes de batches gevolgd.



**Figuur 2** Bovenaanzicht van een tafelhoop.

Op de tafels vindt bij een temperatuur van 50-60 °C verdere afbraak/ omzetting plaats gedurende 40-50 dagen. Naast afbraak vindt er in de tafel ook opbouw van lange koolstofketens plaats (zogenaamde humusstructuren).

Er wordt ook onder een RHP-certificaat gecomposteerd. Voor de partijen die geproduceerd worden voor afzet onder dat certificaat aan de potgrondindustrie is het mengsel iets anders dan voor de reguliere groencompost.



**Figuur 3 Nagerijpte compost.**

Grofweg is de samenstelling/ingangsstromen van gewone compost als volgt:

- zeefoverloop;
- houtsnippers gezeefd;
- zeefgrond;
- gras;
- blad.

Voor RHP-compost zijn dit:

- zeefoverloop;
- houtsnippers gezeefd;
- gras;
- blad;
- kienhout (kienhout is een vezelachtig afvalproduct van potgrondbedrijven (groeve veenfractie)).

Gras en blad worden bij binnenkomst (apart) ingekuuld. Daarbij worden alle grasstromen die worden aangeboden door elkaar gemengd in de graskuil en het blad in de bladkuil. Gras komt veelal uit het buitengebied (berm- en slootmaaisel) en van de provinciale- en rijkswegen. Er wordt ook gras van een vliegveld aangevoerd. De grashoop was bij bemonstering vrij warm. Op gezette tijden wordt de hoop met water gekoeld/bevochtigd.



**Figuur 4 Gras van verschillende herkomst.**

Er is een aantal toelatingen van azolen in openbaar groen, sport- en golfterreinen. Zo is Caramba met als werkzame stof metconazool (60 g/l) toegestaan op golfgreens en in de graszodenteelt. De dosering is dan 1,5 liter/ha. Het kan worden ingezet ter bestrijding van fusarium, sneeuwschimmel, bladvlekkenziekte en kroonroest. Prosaro met als werkzame stoffen prothioconazool (125 g/l) en metconazool (125 g/l) kan ook worden ingezet ter van fusarium, sneeuwschimmel, bladvlekkenziekte en roest in de graszaadteelt en graszodenteelt in een dosering van 1 l/ha met maximaal 2 toepassingen in graszodenteelt. Rosacur Pro is een middel met als werkzame stof tebuconazool (250 g/l) dat ter bestrijding van roest in boomkwekerijgewassen in de vollegrond kan worden toegepast in een dosering van 0,1 % ( 1kg per 1000 liter). Het middel is ook voor particulieren beschikbaar voor bestrijding van echte meeldauw en sterroetdauw in rozen en andere siergewassen in de tuin (45, 9 g/l) en dosering 0,25-0,35% met een maximale dosering van 120 ml/m<sup>2</sup>.

Blad komt veelal uit bebouwde gebieden waar het wordt ingezameld/geveegd. Meestal is het afkomstig uit het openbaar groen dat in beheer is van gemeentes. Een exacte herkomst van het materiaal is niet te bepalen.



**Figuur 5 en 6 Ingekuild blad van verschillende herkomst.**

Het bladafval dat is bemonsterd, is najaar 2012 ingekuild. Het is zeer sterk ineengedrukt met waarschijnlijk zuurstofarme condities in het midden van de hoop. Ook kan door de (relatief)

grote druk/dichtheid de temperatuur (behoorlijk) hoger zijn dan de omgevingstemperatuur (hypothese).

Het groenafval dat binnenkomt wordt gesnipperd en vervolgens gezeefd. De fijne fractie (zeefgrond) gaat gedeeltelijk terug het groencompostproces in en wordt voor een groot deel apart gecomposteerd.



**Figuur 7 Zeefgrond.**

De snippers worden opgeslagen totdat ze het composteerproces ingaan. Ook hierbij is de herkomst van het materiaal moeilijk te bepalen/achterhalen. Hoofdzakelijk is het afkomstig van particulieren (via milieustraten), openbaar groen en aannemers.

De zeefoverloop is de houtfractie die na het zeven van het eindproduct (compost) overblijft. Deze fractie wordt weer terug in het nieuwe proces gebracht om structuur aan de hoop te geven en het materiaal te enten.



**Figuur 8 Zeefoverloop.**

Er bestaat dus een mogelijkheid dat zowel blad als gras uit openbaar en privaat groen sporen van azolen bevat. Dit hebben we in dit project niet nader onderzocht.

## 2 **Aanvullende informatie over gebruik azolen en bemonsterd materiaal in bloembol- lenteelt (tulp)**

### **Broeiafval**

Dit betreft broeiafval van de tulpenbroei. Het materiaal bestaat uit afgebroeide bollen, potgrond en houtsnippers. De broei vindt plaats in bakken in potgrond. De houtsnippers zijn bij een extern bedrijf in een nabij gelegen dorp gekocht en bestaan uit versnipperde bomen/struiken. De herkomst is verder onbekend. Het hout dient als toeslagstof voor de compostering.

De compostering is gestart begin juli 2013. Het materiaal is ter plekke gemengd en op lange rijen gezet. Het materiaal wordt 1x per 3 weken omgezet. Onbekend is of de hoop op de monstername dag al een keer is omgezet.

Er zijn 3 monsters genomen: op oppervlak, op ongeveer 5 cm diepte en op ongeveer 10 cm diepte.



**Figuur 9 en 10** Overzicht van composteringsrijen en close up van composteringsmateriaal.

De bollen zijn in de periode november 2012-mei 2013 gebroeid. Er is een groot aantal cultivars gebroeid. De bollen zijn in het seizoen 2011-2012 geteeld. In oktober 2011 zijn de bollen geplant.

Een gedeelte van het plantgoed is vlak voor het planten ontsmet met Rudis (werkzame stof prothioconazool). De dosering bij bolontsmetting is 0,2% en de dosering dient te worden aangepast aan de wateropname. Het gebruik is gemaximaliseerd op 1,25 l/ha. In de teelt is in mei 2012 het gewas 1 keer met Rudis bespoten in een concentratie van 0,25 l/ha (gehalte werkzame stof 480 g/l, dus 0,12 kg/ha w.s.). Samen met de bolontsmetting komt dat op 1,5 l/ha of 0,72 kg/ha aan werkzame stof prothioconazool per teeltseizoen. Daarnaast is er 2 maal Folicur (werkzame stof tebuconazool) gespoten (eind april en begin mei 2012) in een concentratie van 0,3 l/ha. Bij een gehalte aan werkzame stof van 0,43 kg/l komt dit overeen met 0,26 kg/ha werkzame stof per teeltseizoen. De totale hoeveelheid aan beide azolen bedraagt dan ruwweg 1 kg w.s. per ha per seizoen.

### **Pelafval**

Er is 1 monster pelafval genomen. Het betreft pelafval van bollen die in juni/juli 2013 zijn gerooid. Ook hier is het gebruik aan azolen in het betreffende teeltseizoen 2012-2013 vergelijkbaar met het seizoen 2011-2012 (zie onder broeiafval). Alleen is in 2013 de gewasbespuiting met Rudis achterwege gebleven.





**Figuur 11 en 12 Close up van composteringsmateriaal en overzicht van pelafval rij.**

### **Toegelaten azoolhoudende gewasbeschermingsmiddelen in de tulpenteelt**

Er zijn 2 werkzame azoolstoffen in gebruik in de tulpenteelt: tebuconazool en prothioconazool. De merknamen met als werkzame stof tebuconazool zijn Folicur, Spirit en Phantom. De merknamen met als werkzame stof prothioconazool zijn Rudis.

### **3 Aanvullende informatie over gebruik azolen en bemonsterd materiaal in potplantenteelt**

Er is op 19 juli 2013 bij een potplanten/kuipplanten kwekerij bemonsterd. Er zijn monsters genomen van het potgrondmengsel waarin de planten in pot staan. Dit potgrondmengsel is in samenwerking met de substraatleverancier ontwikkeld en wordt als zodanig samengesteld en kant en klaar op bedrijf aangeleverd door leverancier. De plant komt als bewortelde stek aan en wordt gedurende een aantal maanden opgekweekt. Eind mei/begin juni zijn de 15 cm lange stekken op het bedrijf opgepot. In dit stadium staan er zo'n 20 potten per m<sup>2</sup>. Naarmate de plant groeit, zal hij wijder worden gezet naar uiteindelijk 10 potten per m<sup>2</sup>. In de periode feb-april van het volgende jaar zal de frequentie van toepassing van Tilt een stuk hoger liggen. Dit is de periode vlak voor uitlevering.

De bemonsterde plant is *Lantana camara*. Begin juli 2013 is er een keer met Tilt (w.s. propiconazool, 250 gram per liter) gespoten. Dit is gebeurd met een spuitboom. Tilt wordt gebruikt als groeiregulator om te zorgen dat vertakking wordt gestimuleerd en er een meer gedrongen plant ontstaat. Er is 20-40 ml middel per 100 liter water gebruikt. Er is 60 liter water op 1100 m<sup>2</sup> gebruikt. Dit komt overeen met 500-530 liter water per ha. Bij 200.000 potten per ha, 500 liter spuitvloeistof per ha en 100-200 ml middel per ha (is 25 gram-50 gram werkzame stof per ha), zal elke pot 0,125-0,25 mg werkzame stof als bladbespuiting ontvangen.



**Figuur 13 en 14 Potplantenteelt.**

Ter vergelijking is potgrond waarin het gewas *Solanum* groeit, ook bemonsterd. In deze teelt is tot op heden geen Tilt gebruikt. Er wordt gebruik gemaakt van een eb en vloed systeem. In de warme periode wordt er om de dag een laag water op de vloer gezet. In de winterperiode is dat 1x per 2 weken. Het water wordt hergebruikt en opgeslagen in een silo. Het water wordt niet ontsmet maar er wordt wel gebruik gemaakt van een zand- en fijnfilter. In het gerecirculeerde water kunnen dus nog sporen van azolen zitten die via het eb- en vloed systeem ook in niet behandelde (qua spuiten) potten met plantmateriaal te vinden zijn.

#### **4 Aanvullende informatie over gebruik azolen en bemonsterd stro**

Stro is een bijproduct van de graanteelt. Graan wordt in alle Nederlandse akkerbouwgebieden geteeld. Binnen de granen wordt onderscheid gemaakt tussen winter- en zomergranen. Wintergranen worden gezaaid tussen half september en begin februari en eind juli of in augustus geoogst. Zomergranen worden tussen eind maart en begin mei gezaaid en eveneens in augustus geoogst.

Er is stro bemonsterd van 5 verschillende bedrijven, waarvan 3 gangbare (tarwestro) en 2 biologische bedrijven (1 tarwestro en 1 roggestro).

Er zijn in totaal 5 stromonsters geanalyseerd op *A. fumigatus*. Het bemonsterde materiaal was droog en heeft ca. 2-3 maanden in de opslag gelegen. Het vochtgehalte is niet bepaald. Waarschijnlijk is al het stro onder droge optimale condities van het land gehaald, gezien het weer in de zomer van 2013.

Er is geen navraag gedaan naar de gewasbeschermingsmiddelen zijn gebruikt op de graanpercelen waar het stro vandaan kwam. Het is zeer aannemelijk dat op de gangbare percelen azool-fungiciden zijn ingezet, omdat deze uitmaken van vrijwel alle spuitschema's in de tarweteelt. Telers combineren vaak meerderde fungiciden, om resistentie-ontwikkeling bij plantpathogene schimmels te voorkomen en resistente schimmels toch te kunnen bestrijden. In de biologische graanteelt zijn geen chemische fungiciden gebruikt.



**Figuur 15 Stro.**

Telers kunnen het stro gebruiken als bodemverbeteraar, door het in de grond onder te werken. Vaak (zeker als de stroprijs goed is) wordt het stro in balen geperst en dan verkocht. Het materiaal kent vele toepassingen, bijvoorbeeld in hokken en stallen voor vee maar ook als afdekmiddel in de bollenteelt en de vollegrondsaardbeienteelt. Met name in de veeteelt kunnen de temperaturen oplopen. Deze toepassingen zijn in de huidige bemonsteringsronde niet meegenomen.

**CLM Onderzoek en Advies**

**Postadres**

Postbus 62  
4100 AB Culemborg

**Bezoekadres**

Gutenbergweg 1  
4104 BA Culemborg

T 0345 470 700  
F 0345 470 799

[www.clm.nl](http://www.clm.nl)